

(12) DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITÉ DE COOPÉRATION  
EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(19) Organisation Mondiale de la Propriété  
Intellectuelle  
Bureau international



(43) Date de la publication internationale  
14 juillet 2005 (14.07.2005)

PCT

(10) Numéro de publication internationale  
**WO 2005/063810 A1**

(51) Classification internationale des brevets<sup>7</sup> :  
**C07K 14/52** // (C07K 14/52, 14:47)

(21) Numéro de la demande internationale :  
PCT/FR2004/050748

(22) Date de dépôt international :  
22 décembre 2004 (22.12.2004)

(25) Langue de dépôt : français

(26) Langue de publication : français

(30) Données relatives à la priorité :  
0315265 23 décembre 2003 (23.12.2003) FR

(71) Déposants (pour tous les États désignés sauf US) :  
**BIOMERIEUX** [FR/FR]; Chemin de l'Orme, F-69280  
Marcy l'Etoile (FR). **INSTITUT NATIONAL DE LA  
SANTÉ ET DE LA RECHERCHE MÉDICALE  
(I.N.S.E.R.M.)** [FR/FR]; 101, rue de Tolbiac, F-75654  
Paris Cedex 13 (FR).

(72) Inventeurs; et

(75) Inventeurs/Déposants (pour US seulement) : **PERRON,  
Hervé** [FR/FR]; 4, allée de la Guignonnière, F-69290  
Saint Genis les Ollières (FR). **EVENO-NOBILE, Anne**  
[FR/FR]; 57, impasse du Janin, F-38110 Dolomieu (FR).  
**PORTOUKALIAN, Jacques** [FR/FR]; Chemin de la  
Forêt, F-38200 Chuzelles (FR). **BATTAIL-POIROT,  
Nicole** [FR/FR]; 6, quai Jules Courmont, F-69002 Lyon  
(FR).

(74) Mandataire : **DORGET, Elisabeth**; Chemin de l'Orme,  
F-69280 Marcy l'Etoile (FR).

(81) États désignés (sauf indication contraire, pour tout titre de  
protection nationale disponible) : AE, AG, AL, AM, AT,  
AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO,  
CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB,  
GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG,  
KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG,  
MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NI, NO, NZ, OM, PG, PH,  
PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN,  
TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) États désignés (sauf indication contraire, pour tout titre  
de protection régionale disponible) : ARIPO (BW, GH,  
GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM,  
ZW), eurasién (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM),  
européen (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI,  
FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, MC, NL, PL, PT, RO,  
SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN,  
GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

**Déclaration en vertu de la règle 4.17 :**

— relative à la qualité d'inventeur (règle 4.17.iv)) pour US  
seulement

**Publiée :**

— avec rapport de recherche internationale  
— avant l'expiration du délai prévu pour la modification des  
revendications, sera republiée si des modifications sont re-  
çues

[Suite sur la page suivante]

(54) Title: ISOLATED CYTOTOXIC FACTOR ASSOCIATED WITH MULTIPLE SCLEROSIS AND METHOD OF DETECT-  
ING SAID CYTOTOXIC FACTOR

(54) Titre : FACTEUR CYTOTOXIQUE ISOLE ASSOCIE A LA SCLEROSE EN PLAQUES ET PROCEDE DE DETECTION  
DUDIT FACTEUR CYTOTOXIQUE

(57) Abstract: The invention relates to an isolated cytotoxic factor which is associated with multiple sclerosis and which is selected  
from heterocomplex GM2AP/GM2/MRP14 and mutated GM2AP/GM2/MRP14, and to the method of detecting said factor in a  
biological sample to be tested. The inventive method comprises the following steps consisting in: (i) bringing the biological sample  
into contact with (a) at least one capture antibody selected from antibodies that bind specifically to protein GM2AP, to the mutated  
GM2AP protein, to protein MRP14, to complex GM2AP/GM2, to the mutated GM2AP/GM2 complex and to complex MRP14/GM2,  
and (b) at least one labelled detection antibody selected from antibodies that bind specifically to protein GM2AP, to the mutated  
GM2AP protein, to protein MRP14, to complex GM2AP/GM2, to the mutated GM2AP/GM2 complex and to complex MRP14/GM2;  
and (ii) detecting and/or quantifying the cytotoxic factor by detecting and/or quantifying the labelled detection antibody.

(57) Abrégé : Facteur cytotoxique isolé, associé à la sclérose en plaques, choisi parmi l'hétérocomplexe GM2AP/GM2/MRP14 et  
GM2AP mutée/GM2/MRP14 et son procédé de détection dans un échantillon biologique à tester, selon lequel (i) on met en contact  
l'échantillon biologique avec au moins un anticorps de capture, choisi parmi les anticorps qui se lient spécifiquement à la protéine  
GM2AP, à la protéine GM2AP mutée, à la protéine MRP14, au complexe GM2AP/GM2, au complexe GM2AP mutée/GM2, et au  
complexe MRP14/GM2 ; et avec au moins un anticorps de détection marqué, choisi parmi les anticorps qui se lient spécifiquement  
à la protéine GM2AP, à la protéine GM2AP mutée, à la protéine MRP14, au complexe GM2AP/GM2, au complexe GM2AP mu-  
tée/GM2, et au complexe MRP14/GM2, et (ii) on détecte et/ou quantifie le facteur cytotoxique par détection et/ou quantification de  
l'anticorps de détection marqué.

WO 2005/063810 A1



— avec la partie réservée au listage des séquences de la description publiée séparément sous forme électronique et disponible sur demande auprès du Bureau international

En ce qui concerne les codes à deux lettres et autres abréviations, se référer aux "Notes explicatives relatives aux codes et abréviations" figurant au début de chaque numéro ordinaire de la Gazette du PCT.

**FACTEUR CYTOTOXIQUE ISOLE ASSOCIE A LA SCLEROSE EN PLAQUES  
ET PROCEDE DE DETECTION DUDIT FACTEUR CYTOTOXIQUE**

La sclérose en plaques est une maladie chronique du système nerveux central de l'homme, évoluant par succession de phases de rémission et de poussée ou selon une progression régulière, dont la caractéristique anatomopathologique consiste en la formation de zones de démyélinisation bien délimitées dans la substance blanche du cerveau et de la moelle épinière.

Au niveau histologique, ces zones présentent au stade précoce du processus lésionnel, une dégradation de la myéline péri-axonale associée à une atteinte des cellules gliales responsable de cette démyélinisation. Une activation macrophagique inflammatoire impliquant les cellules microgliales (macrophages tissulaires résidants du système nerveux central), ainsi que, probablement, des macrophages provenant de monocytes sanguins infiltrés, est associée à ce processus de démyélinisation et contribue à la destruction des feuillets myélinisés. Au centre de la zone démyélinisée, une déplétion relative en cellules gliales est retrouvée alors qu'une prolifération d'astrocytes se développe à la périphérie et peut envahir la plaque démyélinisée pour générer une plaque fibreuse ou gliotique. Ces structures sclérotiques sont à l'origine du nom donné à la maladie.

Une autre caractéristique de ces plaques est leur association quasi systématique avec un élément vasculaire autour duquel elles se développent.

Au niveau histologique, on observe une altération fréquente de la barrière hémato-encéphalique (BHE) constituée par l'endothélium capillaire. Un des éléments déterminants dans le maintien de la BHE est constitué par la présence sous-jacente d'extensions cytoplasmiques des

astrocytes, appelées pieds astrocytaires. Vraisemblablement, les pieds astrocytaires induisent la formation ou permettent le maintien de structures de jonction étanches qui assurent la cohésion de la barrière endothéliale capillaire concrétisant la BHE. Or, différents modèles pathologiques font état de l'altération de la BHE et d'une déplétion des pieds astrocytaires.

Par ailleurs, dans le processus lésionnel de la SEP, l'altération de la BHE contribue à amplifier la réponse inflammatoire associée, par l'afflux de cellules lymphoïdes provenant de la circulation sanguine. La contribution de l'inflammation associée aux cellules immunitaires est importante dans la SEP et participe au processus lésionnel.

L'étiologie de la SEP est source d'un débat d'actualité car la maladie pourrait avoir des origines diverses. Des hypothèses ont été émises sur une origine bactérienne et/ou virale. Par ailleurs, comme décrit dans la demande de brevet WO 95/21859, H. Perron et al. ont été conduits à rechercher un ou des agents effecteurs du processus pathogénique aboutissant à la formation typique de plaques de démyélinisation et à une gliose astrocytaire. Dans le cadre de cette étude, ils ont mis en évidence la présence dans le liquide céphalo-rachidien (LCR) et le sérum de patients SEP d'au moins un facteur qui présente une activité toxique vis à vis des cellules astrocytaires et oligodendrocytaires humaines ou animales. Cette activité toxique se caractérise par une désorganisation cytomorphologique du réseau de filaments intermédiaires et/ou une dégradation des protéines desdits filaments et/ou une mort cellulaire par apoptose des cellules gliales. Ils ont établi une corrélation significative entre la détection *in vitro* de cette activité toxique dans des échantillons de LCR et de sérum de patients SEP et la sclérose en plaques par un dosage colorimétrique quantitatif au bromure de

méthyltétrazolium (MTT) des cellules vivantes, comme décrit dans la demande de brevet WO 95/21859. Par ailleurs, C. Malcus-Vocanson et al.<sup>1,4</sup> ont montré que l'urine est un fluide biologique très favorable pour la détection de l'activité de ce facteur toxique et développé un procédé utilisant la cytométrie de flux pour détecter et/ou quantifier les cellules gliales adhérentes mortes par apoptose. Toutes les informations concernant ce procédé sont décrites dans la demande de brevet WO 98/11439.

Des essais ont été réalisés à partir d'une fraction protéique de LCR et d'urine de patients SEP pour tenter d'identifier ce facteur toxique. Le contenu protéique de chaque fraction a été séparé sur gel SDS-PAGE 12 % et observé après coloration du gel à l'argent. Parmi les protéines observées, une fraction protéique centrée sur un poids moléculaire apparent d'environ 21 kD a été trouvée minoritairement associée à l'activité toxique détectée *in vitro* et une fraction centrée sur un poids moléculaire apparent d'environ 17 kD a été trouvée majoritairement associée à cette activité toxique.

Une injection de la fraction provenant de LCR de patients SEP dans le cerveau de rat Lewis et une observation histologique post-mortem de coupes de cerveau des rats a permis d'observer, trois mois après l'injection, une apoptose de la population astrocytaire et la formation de plaques de démyélinisation. Toutes les informations sont contenues dans la demande de brevet WO 97/33466. Ces observations sont conformes à celles qui ont pu être faites sur des coupes de cerveau de patients atteints de SEP, après biopsie<sup>5</sup>.

Des protéines potentiellement associées à cette activité toxique vis à vis des cellules gliales dans des échantillons biologiques de patients SEP ont été étudiées comme décrit dans la demande de brevet WO 01/05422. Les

protéines GM2AP (précurseur de l'activateur du ganglioside GM2) et la saposine B ont ainsi été dosées dans les urines de patients SEP et non SEP. Les résultats présentés dans la demande de brevet WO 01/05422 montraient que le GM2AP et la saposine B étaient présents à de fortes concentrations dans les urines de patients SEP par rapport aux concentrations retrouvées chez des individus non SEP et que ces deux protéines qui sont co-détectées dans les urines de patients SEP pouvaient représenter un marqueur de la pathologie. Les inventeurs avaient également établi une corrélation entre la détection des protéines GM2AP et saposine B dans les urines et la gliotoxité mesurée dans ces urines par le test MTT et montré qu'il existait une corrélation entre concentration urinaire élevée et gliotoxité pour ces deux protéines. Les inventeurs en concluaient que les protéines GM2AP et/ou saposine B étaient impliquées dans le mécanisme de gliotoxité et qu'elles pouvaient vraisemblablement agir en combinaison pour induire la gliotoxité.

Les présents inventeurs ont maintenant voulu connaître l'activité des protéines identifiées dans la demande de brevet WO 01/05422 par utilisation du test MTT et voir si la gliotoxité découverte dans les urines de patients atteints de sclérose en plaques était liée aux protéines identifiées.

Contre toute attente, les présents inventeurs ont montré que ce n'était ni les protéines identifiées dans WO 01/05422 prises individuellement, ni l'association des protéines GM2AP/saposine B qui étaient impliquées dans la gliotoxité et que de manière tout à fait surprenante l'agent responsable de l'activité gliotoxique et impliqué dans la cytotoxicité correspondait à un hétérocomplexe GM2AP/GM2/ MRP14 (calgranuline B) ou GM2AP mutée/GM2/MRP14, comme décrit dans les exemples qui suivent. GM2 ou

ganglioside GM2 est un lipide complexe présent dans le tissu cérébral.

Aussi, la présente invention a pour objet le facteur cytotoxique isolé, purifié, associé à la sclérose en plaques, ledit facteur cytotoxique étant l'hétérocomplexe GM2AP/GM2/MRP14 ou GM2AP mutée/GM2/MRP14, étant entendu que GM2AP mutée correspond à la séquence SEQ ID NO : 2. Ces hétérocomplexes isolés, purifiés, sont utiles comme marqueurs de la pathologie SEP et plus précisément d'une forme de la maladie, d'un stade de la maladie, d'une période d'activité de la maladie, ainsi que dans le suivi de patients traités pour cette pathologie.

Les présents inventeurs ont alors mis au point un procédé, une composition et un mélange réactionnel pour détecter et/ou quantifier les hétérocomplexes GM2AP/GM2/MRP14 et GM2AP mutée/GM2/MRP14 dans des échantillons d'individus susceptibles d'être atteints de sclérose en plaques ou présentant des signes cliniques de cette pathologie.

Le procédé consiste à détecter et/ou de quantifier le facteur cytotoxique, associé à la sclérose en plaques, dans un échantillon biologique, en isolant dudit échantillon biologique l'hétérocomplexe GM2AP/GM2/MRP14 ou GM2AP mutée/GM2/MRP14. Par isolement de l'hétérocomplexe on entend toutes les conditions qui permettent la détection spécifique de l'hétérocomplexe. L'isolement dudit hétérocomplexe peut être effectué par tous moyens appropriés. On peut citer à titre d'exemple les électrophorèses non dénaturantes, les chromatographies sur colonne, les méthodes permettant la dégradation des composés du milieu biologique, à l'exception de l'hétérocomplexe (tel que par exemple un traitement à la protéinase K), ainsi que toute autre méthode permettant de détecter une caractéristique physico-chimique dudit hétérocomplexe, telle

que la masse moléculaire, le point isoélectrique ou tout autres moyens appropriés.

Dans mode de réalisation de l'invention on utilise au moins un anticorps ou au moins deux anticorps qui se lie(nt) spécifiquement à l'hétérocomplexe, et ledit facteur cytotoxique est détecté et/ou quantifié par la mise en évidence de la formation d'un complexe constitué par l'hétérocomplexe et l'anticorps ou par la mise en évidence d'un complexe constitué par l'hétérocomplexe et les deux anticorps. De préférence au moins l'un desdits anticorps est un anticorps de capture et au moins l'autre des anticorps est un anticorps de détection.

L'anticorps de capture est choisi parmi les anticorps qui se lient spécifiquement au complexe GM2AP/GM2, au complexe GM2AP mutée/GM2, au complexe MRP14/GM2, au complexe GM2AP/MRP14 et au complexe GM2AP mutée/MRP14, et l'anticorps de détection est choisi parmi les anticorps qui se lient spécifiquement au complexe GM2AP/GM2, au complexe GM2AP mutée/GM2, au complexe MRP14/GM2, au complexe GM2AP/MRP14 et au complexe GM2AP mutée/MRP14.

Dans un autre mode de réalisation, on isole l'hétérocomplexe à l'aide d'au moins deux anticorps dont au moins l'un se lie spécifiquement à GM2AP ou GM2AP mutée de l'hétérocomplexe et au moins l'autre se lie spécifiquement à MRP14 de l'hétérocomplexe, et on détecte et/ou quantifie ledit facteur cytotoxique par la mise en évidence de la formation d'un complexe constitué par l'hétérocomplexe et les deux anticorps. De préférence, au moins l'un desdits anticorps précités est un anticorps de capture et au moins l'autre desdits anticorps est un anticorps de détection.

Dans les modes de réalisation précités, la mise en évidence de la formation du complexe constitué par l'hétérocomplexe et au moins un anticorps ou par l'hétérocomplexe et au moins deux anticorps peut être



réalisée par tous moyens appropriés, par exemple par criblage en fonction de la taille à l'aide d'un appareil de tri, par criblage en fonction de la masse moléculaire à l'aide d'une colonne de séparation ou par marquage direct ou indirect d'au moins un anticorps ou par tout autre moyen approprié.

Dans un mode de réalisation le procédé consiste à (i) (i) disposer d'un échantillon biologique à tester, (ii) mettre en contact ledit échantillon biologique avec au moins un anticorps de capture, ledit anticorps de capture étant choisi parmi les anticorps qui se lient spécifiquement à la protéine GM2AP, à la protéine GM2AP mutée, à la protéine MRP14, au complexe GM2AP/GM2, au complexe GM2AP mutée/GM2 et au complexe MRP14/GM2 ; et avec au moins un anticorps de détection marqué, ledit anticorps de détection étant choisi parmi les anticorps qui se lient spécifiquement à la protéine GM2AP, à la protéine GM2AP mutée, à la protéine MRP14, au complexe GM2AP/GM2, au complexe GM2AP mutée/GM2 et au complexe MRP14/GM2, et (iii) on détecte et/ou quantifie le facteur cytotoxique par détection et/ou quantification de l'anticorps de détection marqué, étant entendu que GM2AP mutée correspond à la séquence SEQ ID NO : 2.

De préférence, on réalise la détection et/ou la quantification du facteur cytotoxique en utilisant différents principes d'immunoessais qui sont bien connus de l'homme du métier, tels que ELISA et ELFA et avantageusement on utilise un immunoessai de type « sandwich ». L'immunoessai « sandwich » peut être réalisé en une ou plusieurs étapes, c'est à dire sans étape de lavage ou avec une ou plusieurs étapes de lavage.

L'anticorps ou les anticorps de détection sont marqués par tout marqueur approprié. Le marquage peut ainsi être un marquage radioactif, un marquage par une enzyme, un marquage par une molécule fluorescente, un marquage par une

vitamine, un marquage colorimétrique. Dans la présente invention le marqueur est de préférence une vitamine, la biotine, la détection est réalisée par l'addition de streptavidine couplée à la peroxydase de raifort et la révélation est effectuée par addition de dihydrochlorure d'orthophénylènediamine.

L'anticorps ou les anticorps de capture sont immobilisés directement ou indirectement sur une phase solide.

Le terme « anticorps » utilisé dans la présente invention englobe les anticorps monoclonaux et polyclonaux, leurs fragments et leurs dérivés. Par fragment d'anticorps on entend les fragments F(ab)<sub>2</sub>, Fab, Fab', sFv d'un anticorps natif<sup>6,7</sup> et par dérivé on entend, entre autres, un dérivé chimérique d'un anticorps natif<sup>8,9</sup>. Ces fragments d'anticorps et dérivés d'anticorps conservent la capacité de se lier sélectivement à l'antigène cible. Il peut être avantageux d'utiliser des anticorps humanisés. Les formes « humanisées » d'anticorps non humains, par exemple murins, sont des anticorps chimères qui comprennent une séquence minimale dérivée d'une immunoglobuline non humaine. Pour la plupart, les anticorps humanisés sont des immunoglobulines humaines (anticorps récepteur) dans lesquelles des résidus d'une région hypervariable du récepteur sont remplacés par des résidus d'une région hypervariable d'une espèce donneur (anticorps donneur) non humaine, telle que souris, rat, lapin ou primate non humain, ayant la spécificité, l'affinité et la capacité souhaitées. Dans certains cas, les résidus (FR) de la région Fv de l'immunoglobuline humaine sont remplacés par des résidus correspondants non humains. De plus, les anticorps humanisés peuvent comprendre des résidus qui ne sont pas trouvés dans l'anticorps receveur ou dans l'anticorps donneur. Ces modifications sont effectuées pour améliorer les performances de l'anticorps. En général,

l'anticorps humanisé comprendra au moins et de préférence deux domaines variables, dans lesquels tout ou à peu près tout des boucles hypervariables correspondent à une immunoglobuline non humaine et tout ou à peu près tout des régions FR seront celles d'une immunoglobuline humaine. Les anticorps humanisés facultativement pourront aussi comprendre au moins une partie d'une région constante (Fc) d'une immunoglobuline, telle qu'une immunoglobuline humaine<sup>10,11,12</sup>. On peut citer notamment les anticorps anti-GM2AP et anti-MRP14 décrits dans la demande WO 01/05422.

Mais la découverte surprenante que l'agent responsable de l'activité gliotoxique et impliqué dans la cytotoxicité correspond à l'hétérocomplexe GM2AP/GM2/MRP14 ou GM2AP mutée/GM2/MRP14 permet la production d'anticorps anti-hétérocomplexe qui sont capables de se lier spécifiquement au complexe GM2AP/GM2, au complexe GM2AP mutée/GM2, au complexe MRP14/GM2, au complexe GM2AP/MRP14 ou au complexe GM2AP mutée/MRP14. La production de tels anticorps est bien connue de l'homme de l'art. L'hétérocomplexe GM2AP/GM2/MRP14 ou GM2AP mutée/GM2/MRP14 est utilisé comme immunogène pour immuniser des souris BALB/c par injection par voie intrapéritonéale. La première injection est réalisée avec de l'adjuvant complet de Freund. Les autres injections sont réalisées à 4-8 semaines d'intervalle avec de l'adjuvant de Freund incomplet. Un dernier rappel est effectué quelques jours avant la fusion en eau physiologique. Après ce rappel on prélève les rates des souris immunisées et on recueille les splénocytes. Puis, on réalise la fusion des cellules spléniques avec des cellules d'une lignée myélomateuse et on sélectionne les cellules sécrétant des anticorps qui reconnaissent en ELISA l'hétérocomplexe utilisé pour l'immunisation. On sélectionne finalement les clones produisant des anticorps spécifiques

de l'hétérocomplexe immun, c'est à dire qui ne reconnaissent pas ni GM2AP, ou GM2AP mutée, ni MRP14, seuls.

Les anticorps précités peuvent être utilisés dans le procédé de détection et/ou de quantification du facteur cytotoxique soit seuls ou en combinaison.

Dans un mode réalisation préféré du procédé de l'invention, l'échantillon à tester est soumis à un traitement préalable comprenant :

une étape de digestion des protéines de l'échantillon par la protéinase K ; une étape d'inactivation de la protéinase K, par exemple par précipitation à l'acide trichloroacétique, et une étape de neutralisation du pH, par exemple par addition d'un tampon tris-maléate.

L'échantillon biologique à tester est le sérum, le plasma, l'urine ou le liquide céphalorachidien, de préférence l'urine.

De préférence, les anticorps utilisés dans le procédé de l'invention sont les anticorps monoclonaux et polyclonaux suivants : 10E11A11, 13D1E5, 13H9C9, 19C11C10, 2G12H5, 79, 2B9H2, 4A7B10, 5H7C10 et 196. Mais il est bien évident que tout anticorps qui présente la caractéristique de se lier spécifiquement à la protéine GM2AP, à la protéine GM2AP mutée, à la protéine MRP14, au complexe GM2AP/GM2, au complexe GM2AP mutée/GM2, au complexe MRP14/GM2, au complexe GM2AP/MRP14 ou au complexe GM2AP mutée/MRP14 fait partie de l'invention, les procédés pour l'obtention de tels anticorps étant bien connus de l'homme du métier, comme décrit ci-dessus.

De préférence les anticorps utilisés dans le test sandwich ELISA de détection et/ou de quantification de l'invention sont les anticorps monoclonaux et polyclonaux suivants :

- anticorps de capture 10E11A11, 13D1E5, 2G12H5, 4A7B10, 5H7C10, 2B9H2, et 79

- anticorps de détection 10E11A11, 4A7B10, 5H7C10, 2B9H2 13H9C9, 19C11C10, 13D1E5 et 2G12H5.

Les anticorps de capture et de détection sont avantageusement choisis parmi les couples :

- 2B9H2/10E11A11,
- 10E11A11/4A7B10+5H7C10,  
13D1E5+2G12H5/4A7B10+5H7C10,  
79/4A7B10+5H7C10,
- 79/2B9H2,
- 4A7B10+5H7C10/10E11A11,  
4A7B10+5H7C10/13H9C9+19C11C10,  
2B9H2/10E11A11,
- 2B9H2/13H9C9+19C11C10,  
13D1E5+2G12H5/4A7B10+5H7C10,
- 79/2B9H2,
- 4A7B10+5H7C10/10E11A11,
- 4A7B10+5H7C10/13D1E5+2G12H5,
- 2B9H2/13D1E5+2G12H5,
- 2B9H2/13H9C9+19C11C10.

Les anticorps monoclonaux et polyclonaux précités sont nouveaux et font également partie des objets de la présente invention. Leur mode de production sera décrit plus en détail dans la partie expérimentale. Les couples d'anticorps de capture et de détection sélectionnés et préférés sont également nouveaux et font aussi partie des objets de la présente invention.

La présente invention a également pour objet une composition pour la détection et/ou la quantification du facteur cytotoxique (gliotoxique) précité dans un échantillon biologique à tester, ladite composition comprenant au moins un anticorps qui se lie spécifiquement à

l'hétérocomplexe GM2AP/GM2/MRP14 ou GM2AP mutée/GM2/MRP14. De préférence, ladite composition comprend au moins deux anticorps qui se lient spécifiquement à l'hétérocomplexe.

La présente invention a aussi pour objet une composition pour la détection et/ou la quantification du facteur cytotoxique (gliotoxique) précité dans un échantillon biologique à tester, ladite composition comprenant dans un mélange réactionnel et simultanément au moins un anticorps de capture et au moins un anticorps de détection marqué, lesdits anticorps étant choisis parmi les anticorps qui se lient spécifiquement à la protéine GM2AP, à la protéine GM2AP mutée et à la protéine MRP14 de l'hétérocomplexe.

De préférence, les anticorps de capture et de détection sont choisis parmi les anticorps monoclonaux et polyclonaux suivants : 10E11A11, 13D1E5, 13H9C9, 19C11C10, 2G12H5, 79, 2B9H2, 4A7B10, 5H7C10 et 196.

Avantageusement, ladite composition comprend au moins un anticorps de capture choisi parmi les anticorps 10E11A11, 13D1E5, 2G12H5, 4A7B10, 5H7C10, 2B9H2, et 79 ; et au moins un anticorps de détection choisi parmi les anticorps de détection 10E11A11, 4A7B10, 5H7C10, 2B9H2, 13H9C9, 19C11C10, 13D1E5 et 2G12H5.

Les compositions préférées comprennent les couples d'anticorps de capture et de détection suivants :

- 2B9H2/10E11A11,
- 10E11A11/4A7B10+5H7C10,
- 13D1E5+2G12H5/4A7B10+5H7C10,
- 79/4A7B10+5H7C10,
- 79/2B9H2,
- 4A7B10+5H7C10/10E11A11,
- 4A7B10+5H7C10/13H9C9+19C11C10,
- 2B9H2/10E11A11,
- 2B9H2/13H9C9+19C11C10,

- 13D1E5+2G12H5/4A7B10+5H7C10,
- 79/2B9H2,
- 4A7B10+5H7C10/10E11A11,
- 4A7B10+5H7C10/13D1E5+22G12H5,
- 2B9H2/13D1E5+22G12H5,
- 2B9H2/13H9C9+19C11C10.

L'invention a encore pour objet un mélange réactionnel pour la détection et/ou de quantification du facteur cytotoxique (gliotoxique) précité, ledit mélange comprenant au moins deux anticorps dont au moins l'un se lie spécifiquement à GM2AP ou GM2AP mutée de l'hétérocomplexe et au moins l'autre se lie spécifiquement à MRP14 de l'hétérocomplexe. Par mélange réactionnel on entend un milieu homogène ou hétérogène qui comprend simultanément au moins les deux anticorps précités. De préférence, au moins l'un desdits anticorps est un anticorps de capture et au moins l'autre desdits anticorps est un anticorps de détection.

Un autre objet de l'invention est un complexe comprenant l'hétérocomplexe lié à au moins deux anticorps, dont au moins l'un des anticorps est spécifique de GM2AP ou de GM2AP mutée et au moins l'autre anticorps est spécifique de MRP14.

La séquence SEQ ID NO : 1 correspond à la séquence de la protéine GM2AP.

La séquence SEQ ID NO : 2 correspond à la séquence de la protéine GM2AP mutée dans l'exon 2, à la position 40 (remplacement d'un acide aspartique par une phénylalanine).

La séquence SEQ ID NO : 3 correspond à la séquence de la protéine GM2AP mutée, présentant des mutations à la fois dans l'exon 1, dans l'exon 2 et dans l'exon 4.

Dans la description détaillée qui va suivre, lorsque l'on fait référence à la protéine GM2AP, la séquence à

prendre en considération est la séquence identifiée dans l'identificateur de séquence en SEQ ID NO : 1. Par ailleurs, quand on fait référence à la protéine GM2AP mutée, la séquence à prendre en considération est la séquence identifiée dans l'identificateur de séquence en SEQ ID NO : 2 ; étant entendu que dans les séquences SEQ ID NO : 1 et SEQ ID NO : 2 on peut trouver indifféremment à la position 153 une valine ou une alanine, comme expliqué dans la partie expérimentale dans l'exemple 3. Cependant, des expériences équivalentes peuvent être menées en prenant en considération la protéine GM2AP mutée présentant des mutations à la fois dans l'exon 1, dans l'exon 2 et dans l'exon 4, telle qu'identifiée dans l'identificateur de séquence en SEQ ID NO : 3.

#### **Figure.**

La figure annexée représente la courbe dose-réponse du complexe ternaire GM2AP+MRP14+GM2 (GM2 : 50 µg/ml final). Les quantités de MRP14 sont représentées en abscisse (en ng) et le pourcentage de cytotoxicité correspondant au pourcentage de cellules mortes est représenté en ordonnée. Dans la présente figure les quantités de GM2AP en ng sont respectivement représentées par les symboles suivants :

$\phi$  : 5 ng,  $\pi$  : 10 ng,  $\Psi$  : 20 ng,  $\upsilon$  : 50 ng et  $\chi$  : 100 ng.

Une expérience similaire a été réalisée avec la protéine GM2AP mutée au lieu de la protéine GM2. Les résultats obtenus sont similaires à ceux présentés dans la figure annexée.

#### **Exemples.**

##### **Exemple 1 : Protocole du test MTT.**

(i) « Coating » des plaques à la poly-L-lysine.



250 µl de solution de poly-L-lysine (12,5 µg/ml) stériles sont déposés dans tous les puits de plaques 48 puits (Falcon 3078). Après une incubation de 2 heures à 37°C, la solution est aspirée et remplacée par 250 µl d'eau stérile pour laver les puits. Une fois les puits vidés par aspiration, ils sont séchés sous le flux d'air d'un poste de sécurité microbiologique.

(ii) Cellules utilisées

Les cellules CLTT1-1 sont des astrocytes issus de souris transgéniques exprimant le gène large T du polyoma virus<sup>13</sup>. Ces cellules sont cultivées à 37°C en atmosphère humide à 5 % de CO<sub>2</sub>, en Dubelcco's Modified Eagle's Medium (DMEM)/Ham's F12 medium (50/50) 4,5 g/l de D-glucose supplémenté avec 10% de Sérum de Veau Foetal (SVF) non décomplémenté, du glutamax (580 mg/l), de la pénicilline (500 unités/l) et de la streptomycine (500 µg/l).

(iii) Test de cytotoxicité

Les échantillons à tester sont préparés 24 heures avant le dépôt pour le test de toxicité et incubés à 4°C.

Les plaques de 48 puits « coatées » à la poly-L-lysine sont ensemencées avec des cellules CLTT 1-1 à raison de 250 µl de suspension cellulaire (6000 cellules/ml) par puits, soit 1500 cellules/puits.

Après 24 heures d'incubation à 37°C, en atmosphère humide et 5% de CO<sub>2</sub> les échantillons sont déposés à la surface du milieu cellulaire. Chaque échantillon est déposé en trois exemplaires. Certains puits permettent d'évaluer des témoins (T) cellulaires (aucun dépôt d'échantillon) ou des témoins dits TUC (dépôt de 10 µl de solution TUC). Le réactif TUC (TRIS 20 mM, urée 250 mM, CaCl<sub>2</sub> 1 mM) est une solution mimant la chimie de l'urine.

Le dépôt est homogénéisé et, pour éviter toute évaporation, un film protecteur est appliqué sur le dessus des plaques.

Après 72 heures d'incubation à 37°C, en atmosphère humide et 5% de CO<sub>2</sub>, la révélation par le test MTT est réalisée. Le surnageant cellulaire est aspiré en prenant soin de ne pas retirer les cellules du fonds des puits. 250 µl de solution MTT (0.5 mg/ml dans du milieu de culture) sont déposés délicatement sur les cellules. Après 3 heures d'incubation à 37°C, la solution est aspirée et les cristaux de formazan formés dans les cellules sont solubilisés avec de l'isopropanol, HCl 1N (40 µl/ml).

Une fois homogène, 70 µl de solution de chaque puits de la plaque 48 puits sont transvasés dans les puits d'une plaque 96 puits, afin de faire une lecture de densité optique.

Les absorbances sont lues à 570 nm/650 nm.

Le pourcentage de cytotoxicité peut être calculé :

MoyT = moyenne des absorbances des témoins

σT = écart type des absorbances des témoins

CO = CutOff = MoyT - 2 σT

DO = absorbance moyenne des échantillons

% toxicité =  $(1 - (DO / CO)) \times 100$

Pour être valides, les absorbances de chaque échantillon (en trois exemplaires) ne doivent pas avoir un écart type supérieure à 10% de l'absorbance moyenne.

### **Exemple 2 : Préparation de pools d'urine.**

100 litres d'urine SEP (0,2-0,5 litre provenant de la première miction matinale de patients) ont été collectés. Les urines de patients contaminées par voie bactérienne ou celles de patients traités par des médicaments susceptibles d'interférer avec le bioessai de gliotoxité<sup>4</sup> ont été éliminées. Les échantillons individuels ont été testés pour

la gliotoxycité et un pool final de 46 litres d'urine avec une gliotoxycité significative, par le test MTT, a été sélectionné. En parallèle, un volume équivalent d'urine de donneurs sains avec une gliotoxycité négative pour chaque échantillon a été obtenu. Les étapes de concentration et de purification de ce matériel, l'analyse protéique et la stratégie d'identification sont présentés ci-dessous.

- Purification des protéines urinaires.

Les pools d'urine SEP positifs et SEP négatifs ont été purifiés pour obtenir une concentration élevée en protéines.

- (i) Précipitation :

- Des précipitations au sulfate d'ammonium (Prolabo - réf. 21 333 365) ont été effectuées sur les pools d'urine SEP positif et SEP négatif. Le pourcentage de 60 % de sulfate d'ammonium saturé pour 40 % d'urine, soit 390 grammes de sulfate d'ammonium par litre d'urine a été utilisé. Chaque pool est réparti en fractions de 1,8 litres dans des flacons de 2 litres pour améliorer la précipitation. La précipitation a été effectuée durant 2 x 8 heures, à température ambiante, sous agitation douce. Après centrifugation des pools d'urine à 3000 tpm pendant 10 min., à une température de 10°C, le culot obtenu est repris dans un tampon Tris 20 mM contenant du  $\text{CaCl}_2$  1 mM et de l'urée à 0,25 M. Le mélange a ensuite été centrifugé à 3000 tpm pendant 10 min. Le surnageant contient les protéines concentrées. Il est soit utilisé immédiatement pour l'étape suivante, soit congelé si l'étape suivante ne peut être effectuée en continu.

- (ii) Chromatographie par échange d'ions :

- La solution contenant les protéines a ensuite été passée sur un gel DEAE Fast Flow (nom commercial, commercialisé par PHARMACIA). Cette étape est effectuée à basse pression sur une colonne PHARMACIA remplie de gel. Les

tampons sont amenés sur la colonne par une pompe péristaltique qui permet un débit régulier. Le tampon d'équilibration de la colonne est le tampon Tris 20 mM, pH 7. La fraction correspondant au surnageant de précipitation et contenant une quantité de sels trop élevée est dialysée contre ce tampon avant dépôt sur la colonne. Une élution par un gradient salin permet de récupérer les protéines. Le gradient d'élution est effectué par palier de NaCl 100, 200, 300, 500 mM dans le tampon d'équilibration de la colonne. Les fractions d'élution sont testées par le test MTT. Seules les fractions positives, c'est à dire les fractions éluées à 200 mM NaCl, sont conservées. Ces fractions sont traitées immédiatement ou conservées à l'état lyophilisé.

- (iii) Purification :

- Une chromatographie d'exclusion stérique basée sur la différence de taille et de forme des protéines à éluer a été utilisée. La fraction correspondant à l'élution 200 mM NaCl est déposée sur la colonne. Au cours de l'élution, les protéines de faible masse moléculaire sont retenues et donc éluées plus tardivement que les grosses molécules. Les purifications ont été effectuées sur HPLC avec une colonne TosoHaas TSK Prep G 3000 SW, d'un diamètre de 21,5 mm et d'une longueur de 300 mm. La limite d'exclusion en masse moléculaire est de 500 000 daltons . Le tampon d'élution utilisé contient du phosphate 100 mM, du sulfate de sodium 100 mM, à pH 6,8. La séparation du mélange de protéines a été effectué en 60 min. Seule la fraction correspondant à une masse de 15-20 000 daltons a été conservée. Cette fraction est dialysée dans un tampon Tris 20 mM contenant du  $\text{CaCl}_2$  0,2 mM, pH 7,2, puis lyophilisée.

A chaque étape, seules les fractions présentant une activité toxique significative ont été retenues pour l'étape suivante. Un contrôle de l'activité toxique des protéines a été effectué à chaque étape, à l'aide du test MTT. Seules

les fractions présentant une activité toxique significative ont été retenues pour l'étape de purification supplémentaire.

- (iv) Purification supplémentaire des protéines urinaires par chromatographie en phase inverse :

- Les pools d'urine provenant de patients SEP (pool SEP positif) et de patients non SEP (pool SEP négatif), obtenus après purification, ont été repris dans de l'eau distillée, puis dilués avec une solution 0,2% TFA/10% acétonitrile pour obtenir une concentration finale d'environ 130 à 140 µg/ml.

La séparation par HPLC phase inverse C8 a été effectuée sur une colonne Brownlee Aquapore (nom commercial) commercialisée par la société Perkin Elmer (caractéristiques de la colonne : 300 angstroms/7 µm/(100x4,6) mm). Deux colonnes distinctes ont été utilisées respectivement pour les pools positif et négatif. Les injections ont été réalisées par multi-injections de 250 µl. Les protéines ont été éluées avec un gradient linéaire de 5% à 15% de tampon A en 5 min., puis de 15% à 100% de tampon B en 95 min., à un débit de 0,5 ml/min. Les tampons de séparation A et B utilisés sont respectivement le tampon 0,1% TFA (Pierce n° 28904)/ eau MilliQ et le tampon 0,09% TFA/80% acétonitrile (Baker). La détection a été effectuée par mesure de l'absorbance UV à 205 et 280 nm. La collecte des fractions a été effectuée en fractions de 1,5 ml et de 0,5-1 ml dans la zone d'intérêt. Les fractions ont été congelées après la collecte dans de la carboglace.

Les fractions collectées ont ensuite été séchées en Speed Vac et reprises dans 100 µl de 0,1% TFA/30% acétonitrile. 20µl des fractions ont été transférés dans des eppendorfs de 500 µl, séchés et lavés à deux reprises avec 100 µl d'eau MilliQ, puis séchés de nouveau.

L'activité toxique des protéines contenues dans chaque fraction recueillie après élution a été déterminée à l'aide du test MTT. Seule la fraction X76/43 du pool SEP positif présente une activité toxique *in vitro*. Le numéro de cette fraction correspond à l'ordre de l'élution en fonction des conditions d'élution énoncée dans l'exemple. Son activité toxique a été confirmée *in vitro* par FACS sur des cellules astrocytaires murines, comme décrit dans la demande WO 98/11439. Son profil sur SDS-PAGE révélait des bandes protéiques à 55 kDa, 35kDa, 20 kDa, 18 kDa, 14kDa et 8 kDa. La fraction correspondante X76/43 du pool SEP négatif, obtenue à partir des urines de contrôle, ne présentait aucune activité toxique par le test MTT. Son profil sur SDS-PAGE montrait des bandes à 55 kDa, 35 kDa et 20 kDa.

- Analyse des protéines obtenues par séparation sur HPLC sur gel SDS-TRICINE.

Le contenu protéique de la fraction X76/43 du pool témoin SEP négatif et de la fraction X76/43 du pool SEP positif a été observé après séparation sur gel SDS-TRICINE 16% et coloration du gel au zinc/imidazole.

Le pool de collecte de la fraction X76/43 obtenue par HPLC a été déposé sur un gel SDS-TRICINE 16% précoulé de 10 puits et de 1 mm d'épaisseur (commercialisé par la société Novex). Les conditions d'utilisation du gel correspondent à celles préconisées par le fournisseur. L'échantillon est repris dans 75  $\mu$ l du tampon d'échantillon 1 fois concentré (SDS-TRICINE N° LC 1676, 1 ml deux fois concentré + 50 $\mu$ l de  $\beta$ -mercaptoéthanol (Pierce) dilué au 1/2 dans de l'eau) et 25 $\mu$ l de l'échantillon sont déposés sur le gel en trois fois. Le pool de collecte de la fraction X76/43 provenant du pool SEP négatif a été déposé sur le gel dans les mêmes conditions que celles décrites pour le pool SEP positif. La migration sur les deux gels a été effectuée en parallèle dans la même cuve de migration (XCELL II NOVEX

(nom commercial)) à un voltage constant de 125 mV pendant 2 heures. La cuve est placée dans un bac contenant de la glace. Les gels ont été colorés directement après la migration par coloration au zinc/imidazole (kit de coloration 161-0440 commercialisé par la société BIORAD) pour obtenir une coloration négative réversible.

- Digestion à la trypsine des bandes de gel.

Toutes les bandes de protéines visualisées dans les dépôts de la fraction X76/43 ont été découpées et soumises à une protéolyse dans une solution de trypsine pendant une nuit. Les bandes de gels sont découpées au scalpel en tranches de 1 mm et transférées dans des tubes eppendorfs. Les eppendorfs sont soumis à un pic de centrifugation pour faire tomber les morceaux de gel et après centrifugation 100 µl de tampon de lavage (100 mM  $\text{NH}_4\text{CO}_3$ /50%  $\text{CH}_3\text{CN}$ ) sont ajoutés aux morceaux de gel. Après 30 min. d'agitation à température ambiante, le surnageant est enlevé par fractions de 20 µl et l'étape de lavage est renouvelée deux fois. Les eppendorfs sont séchés pendant 5 min. en speed vac. 20 µg de trypsine (Modified sequenal grade PROMEGA V5111) (nom commercial) sont repris dans 200 µl de tampon de digestion (5 mM TRIS, pH 8) et sont dissous pendant 30 min. à température ambiante, sous agitation intermittente et 20 à 30 µl de trypsine resuspendue sont ajoutés aux morceaux de gel. Les eppendorfs sont centrifugés et conservés en chambre chaude à 28°C pendant une nuit. Après digestion les bandes de gel peuvent être utilisées immédiatement pour les mesures de masse ou congelées pour usage ultérieur. Des protéines de poids moléculaires apparents élevés ont été trouvées dans les deux fractions. Par contre les bandes de poids moléculaires apparents de 8, 14, 18 kDa ne sont visibles que dans la fraction X76/43 du pool SEP positif.

**Exemple 3 : Spectrométrie de masse et séquençage des protéines.**

- Analyse par spectrométrie de masse MALDI-TOF des fragments protéolytiques.

30  $\mu$ l de tampon d'extraction (2% TFA/50% acétonitrile) sont ajoutés aux échantillons. Les éppendorfs à analyser sont soumis à une centrifugation de 5 min., puis à une sonication de 5 min. et finalement à une centrifugation de 1 min.

Sur un disque en acier inoxydable, 14 dépôts de 0,5  $\mu$ l de matrice (acide  $\alpha$ -cyano-4-hydroxy-trans-cinnamique à saturation dans de l'acétone) sont réalisés. Une fine couche microcristalline uniforme est obtenue. 0,5  $\mu$ l d'une solution de 2% TFA/eau sont déposés sur cette sous-couche sur les 14 dépôts, puis 0,5  $\mu$ l d'échantillon à analyser sont ajoutés. Dans cette goutte ainsi formée, 0,5  $\mu$ l d'une solution à saturation d'acide  $\alpha$ -cyano-4-hydroxy-trans-cinnamique dans 50% acétonitrile/eau sont ajoutés. Après un séchage à température ambiante pendant 30 min., les dépôts cristallins sont lavés avec 2  $\mu$ l d'eau qui sont immédiatement évacués par un souffle d'air. Tous les spectres sont obtenus sur un spectromètre de masse BRUKER BIFLEX (marque de commerce) équipé d'un réflectron. Les mesures (90 à 120 tirs laser sur l'ensemble du dépôt) sont accumulées pour obtenir un spectre de masse qui soit le plus représentatif de l'ensemble des peptides présents dans le sandwich matrice-échantillon. Pour chaque dépôt, une calibration avec les peptides de l'autolyse de la trypsine a été faite afin de pouvoir utiliser une précision de mesure inférieure à 100 ppm.

Les résultats de spectrométrie de masse ont été recherchés dans les banques de données en utilisant l'algorithme MS-FIT du logiciel Protein Prospector (<http://prospector.ucsf.edu>).



- Séquençage N-terminal des peptides de digestion.

- (i) Extraction et séparation par HPLC des peptides de digestion.

Les peptides obtenus après digestion par la trypsine ont été extraits en 3 fois 30 min. dans un bain de sonication avec 0,1% TFA/60% acétonitrile. Les solutions d'extraction sont réunies et séchées jusqu'à 20 µl en speed vac. Après dilution dans 80 µl de tampon A (0,1 % TFA/eau), les extractions des bandes de gel, digérées avec de la trypsine, sont injectées sur une colonne C18/MZ-Vydac/(125x1,6)mm/5 µm (nom commercial). L'élution des peptides se fait à un débit de 150 µl/min. et dans un gradient allant de 5% de tampon B (0,09% TFA/80% acétonitrile) à 40% de tampon B en 40 min., puis de 40% de tampon B à 100 % de tampon B en 10 min. La détection est faite par mesure de l'absorbance UV à 205 nm. La collecte des pics est effectuée dans des tubes eppendorf de 500 µl. Les pics peptidiques individuels collectés sont ensuite soumis à une analyse de la séquence en acides aminés N-terminale.

- (ii) Séquençage N-terminal :

Les fractions correspondant à un seul pic de masse ont été analysées par dégradation d'Edman sur un séquenceur (Modèle 477A PERKIN ELMER/Applied Biosystems). Les conditions de séquençage sont celles décrites par le constructeur. Une micro cartouche a été utilisée pour le dépôt des échantillons et les PTH-AminoAcid sont identifiés avec un système HPLC online (Modèle 120A PERKIN ELMER/Applied Biosystems).

- Résultats

Les résultats de l'analyse par spectrométrie de masse et du séquençage sont présentés dans le tableau 1 ci-dessous.

Tableau 1

MW (kDa)	ISM		IS	
	SEP	Contrôle	SEP	Contrôle
55	Albumine sérique humaine	Albumine sérique humaine	ND	ND
35	Inhibiteur de la trypsine inter-alpha	Inhibiteur de la trypsine inter-alpha	ND	ND
20	Perlecan*	Perlecan*	Perlecan*	Perlecan
20	NI	NI	Protéine de liaison au rétinol	Protéine de liaison au rétinol
20	NI	NI	Protéine activatrice du GM2	Pas présente Pas détectée
18	Protéine activatrice du GM2	Pas de bande sur le gel	Protéine activatrice du GM2	Pas de bande sur le gel
14	MRP14	Pas de bande sur le gel	MRP14	Pas de bande sur le gel
8	Non identifiée	Pas de bande sur le gel	Saposine B	Pas de bande sur le gel

MW: poids moléculaire moyen

ISM : identification par spectrométrie de masse

IS : identification par séquençage

NI : pics restants non identifiés

ND : non déterminé

\* : identique au fragment G-terminal de 20 kDa du perlecan probablement résultant de la protéolyse antérieure de la protéine complète de 467 kDa dans les urines ou pendant le procédé de purification.

Un mélange de protéines co-purifiées était encore présent à la fois dans la fraction finale de purification SEP et dans la fraction contrôle correspondante. Les protéines identifiées dans ces deux échantillons ont été considérées comme étant non pertinentes en raison de l'absence d'activité gliotoxique dans ces deux fractions.

En conséquence, GM2AP (18kDa), MRP14 ou calgranuline B (14kDa), et saposine B (10 kDa) ont été considérées comme des candidats potentiels pour l'activité gliotoxique.

Par ailleurs, le séquençage N-terminal des fragments digérés par la trypsine de la bande de 18 kDa dans la

fraction SEP a montré la présence de polymorphisme dans différentes positions de GM2AP. Une mutation dans l'exon 1, à la position 19 de la séquence en acides aminés de GM2AP, où une alanine est remplacée par une thréonine. Une mutation dans l'exon 2, où un acide aspartique est remplacé par une phénylalanine à la position 40 de la séquence en acides aminés de GM2AP. Cette mutation n'a jamais été retrouvée dans l'ADN génomique de donneurs sains ou de malades. Deux autres mutations dans l'exon 2, respectivement aux positions 59 et 69 de la séquence en acides aminés de GM2AP qui correspondent au remplacement d'une isoleucine par une valine et d'une méthionine par une valine. Une mutation dans l'exon 4 qui consiste en un remplacement d'une valine par une alanine à la position 153 de la séquence en acides aminés de GM2AP s'est révélé être un nouveau polymorphisme non décrit après différents séquençages de l'ADN génomique de lymphocytes provenant d'individus sains (donneurs de sang) et de patients atteints de sclérose en plaques. Cette mutation dans l'exon 4 a été retrouvée chez 3 sur 27 patients SEP testés, ainsi que chez 8 sur 27 individus de contrôle suggérant un polymorphisme normal. Une autre mutation est retrouvée dans l'exon 4, à la position 171 de la séquence en acides aminés de GM2AP, où une lysine est remplacée par une glutamine.

Les séquences en acides aminés de GM2AP et de GM2AP mutée sont respectivement représentées dans l'identificateur de séquences en SEQ ID NO : 1 et SEQ ID NO : 2, étant entendu que dans ces deux séquences SEQ ID NO : 1 et SEQ ID NO : 2 on peut trouver indifféremment à la position 153 une valine ou une alanine, puisque la mutation dans l'exon 4 pour cette position suggère un polymorphisme normal.

**Exemple 4 : Protéines recombinantes.**

Des protéines recombinantes (achetées ou produites par transfection) ont été utilisées pour évaluer le potentiel gliotoxique des protéines candidates.

Les protéines dites « non humaines », c'est à dire des protéines recombinantes produites dans un système d'expression procaryote (*E. coli*) par transformation avec un plasmide contenant l'insert à exprimer, ou dans un système d'expression eucaryote dans des levures ou cellules d'insectes infectées par le baculovirus ayant intégré l'insert à exprimer, suivantes ont été utilisées :

La protéine MRP14 (ou Calgranuline B ou S100A9) fusionnée en N-terminal avec une queue histidine et produite dans *E. coli* ; la protéine MRP8 (ou Calgranuline A ou S100A8) produite dans *E. coli* ; et l'hétérocomplexe MRP14/MRP8 (ou Calprotectine) natif humain, achetés au Dr C. Kerkhoff (université de Münster, Allemagne).

La protéine GM2AP (précurseur de l'activateur du ganglioside GM2) fusionnée en N-terminal avec une queue histidine produite en Baculovirus et la protéine Sap B (Saposine B) produite en levure, achetés au Pr K. Sandhoff (Institut Kekule, université de Bonn, Allemagne) .

Ces protéines possèdent leur propre activité physiologique décrite dans la littérature.

Les protéines dites « humaines », c'est à dire des protéines recombinantes produites dans un système d'expression eucaryote dans des cellules humaines transfectées par un plasmide approprié ayant intégré l'insert à exprimer ont été produites selon le protocole décrit ci-dessous.

Les cellules 293T (cellules primaires embryonnaires humaines de rein transformées par un adénovirus de type 5, exprimant l'antigène T) ont été cultivées à 37°C en atmosphère humide à 5% de CO<sub>2</sub>, en DMEM 4,5 g/l de D-glucose

supplémenté avec 10% de Sérum de Veau Foetal (SVF) décomplémenté, du glutamax (580 mg/l), de la pénicilline (500 unités/l) et de la streptomycine (500 µg/l).

Pour réaliser la transfection transitoire, des plasmides appropriés contenant le cDNA des protéines d'intérêt, MRP14, GM2AP et GM2AP mutée (Acide aspartique/Phénylalanine/position 40) précédés d'un peptide de sécrétion (IgK) en N terminal, ont été utilisés.

Les cellules 293T sont transfectées avec un réactif « Transfectant » composé de lipides qui complexent et transportent l'ADN dans les cellules. Les cellules 293T sont trypsinées,ensemencées à 2 millions de cellules par flacon de 75 cm<sup>2</sup>, et incubées 1 nuit à 37°C, en atmosphère humide et 5% CO<sub>2</sub> dans 10 ml de milieu de culture (DMEM 4,5 g/l de D-glucose supplémenté avec 10% de sérum de veau foetal (SVF) décomplémenté, du glutamax (580 mg/l), de la pénicilline (100 unités/ml) et de la streptomycine (100 µg/ml)).

La solution de transfection est préparée extemporanément en utilisant le rapport 3/2 [volume de Transfectant (µl)/quantité d'ADN plasmidique (µg)] qsp 1ml de milieu sans SVF.

Après 45 minutes de contact à température ambiante, la solution de transfection est ajoutée goutte à goutte sur un tapis cellulaire non confluent.

Après 72 heures d'incubation à 37°C, en atmosphère humide et 5% CO<sub>2</sub>, les surnageants sont récupérés, centrifugés 10 minutes à 2500 tpm.

La quantification de protéine produite est alors réalisée soit par le kit de dosage MRP Enzyme Immunoassay (nom commercial) commercialisé par BMA Biomedicals AG, Augst, Switzerland, en suivant la notice pour la protéine recombinante humaine MRP14, soit par la technique du Western Blot semi quantitatif avec des anticorps polyclonaux de

lapin anti-GM2AP. Ces techniques donnent des valeurs indicatives pour une comparaison relative.

Les surnageants bruts issus de cette production seront utilisés notamment pour les tests d'activité toxique et de détection.

#### **Exemple 5 : Toxicité des protéines « non humaines ».**

La toxicité des protéines recombinantes « non humaines » MRP14, MRP8, GM2AP, SapB a été évaluée par le test MTT.

Les protéines ont été testées dans une gamme définie à partir de l'évaluation de la concentration de chaque protéine dans différentes urines. Les gammes sont réalisées dans différents tampons, soit dans la solution TUC, soit dans deux types d'urine : des urines provenant de patients atteints de sclérose en plaques et qui étaient toxiques par le test MTT (urine SEP), et des urines provenant d'un recrutement de donneurs non SEP qui n'étaient pas toxiques par le test MTT (urine normale). Les urines avaient au préalable été traitées 30 min. à 56°C et filtrées.

Les résultats montrent que, prises individuellement, les protéines testées dans la solution TUC et dans les urines normales ne sont pas toxiques par le test MTT. Aucun effet significatif des protéines GM2AP, MRP14 et Saposine B n'est mis en évidence dans les urines SEP par le test MTT. On note une inhibition de la toxicité avec une dose MRP8 égale ou supérieure à 3 ng.

Ces résultats sont présentés dans le tableau 2.

Tableau 2A : Gamme dans la solution TUC

Protéine	Quantité en ng	Cytotoxicité en %
GM2AP	5	-48
	2,5	-19
	1,25	-122
	0	-55
MRP14	10	-20
	5	-22

	2,5	-34
	0	-11
<b>Saposine B</b>	50	-9
	40	-8
	30	-16
	20	-3
	10	-16
	0	-18
<b>MRP8</b>	3	-18
	1,5	-19
	0,5	-14
	0	-19

Tableau 2B : Gamme dans les urines

Protéine	Quantité en ng	Urine SEP Cytotoxicité en %	Urine normale Cytotoxicité en %
<b>GM2AP</b>	5	34	-11
	2,5	41	-7
	1,25	32	-13
	0	42	-4
<b>MRP14</b>	10	29	-8
	5	29	10
	2,5	33	9
	0	37	7
<b>Saposine B</b>	100	44	ND
	80	54	ND
	50	58	ND
	30	67	ND
	20	70	ND
	10	69	ND
	0	62	ND
<b>MRP8</b>	3	-18*	8
	1,5	50	5
	0,5	46	10
	0	40	8

Pour MRP14 et MRP8 il s'agit d'un pourcentage de cytotoxicité moyen sur 2 essais

ND: non déterminé

\*dans une autre urine SEP, la même inhibition de toxicité est observée

Des combinaisons de protéines GM2AP/MRP14, Saposine B/MRP14 et Saposine B/GM2AP/MRP14 ont ensuite été préparées dans la solution TUC et dans les deux types d'urine comme décrit ci-dessus. En combinaisons « contrôles », l'hétérocomplexe MRP14/8 ou la protéine MRP8 remplacent la protéine MRP14 dans les différentes combinaisons GM2AP/MRP14/8, Saposine B/GM2AP/MRP8. Les combinaisons « contrôles » ont été préparées de la même manière. Toutes



les combinaisons ont été incubées une nuit à 4°C avant d'être testées pour leur toxicité par le test MTT.

Les résultats sont présentés dans le tableau 3.

Tableau 3A : Gamme dans la solution TUC

Combinaisons de protéines			Cytotoxicité %
GM2AP (ng)	MRP14 (ng)		
20	1		-12
20	0,5		-8
10	1		-9
10	0,5		18*
0	0		0
GM2AP (ng)	MRP14/8 (ng)		
20	20		-14
20	10		-21
10	20		-12
10	10		-16
0	0		0
Sap. B (ng)	MRP14 (ng)		
30	1		-17
30	0,5		-19
15	1		-9
15	0,5		-8
0	0		0
GM2AP (ng)	MRP14 (ng)	Sap. B (ng)	
20	1	30	-11
20	1	15	-4
20	0,5	30	-15
20	0,5	15	-14
10	1	30	-9
10	1	15	-5
10	0,5	30	-21
10	0,5	15	-17
0	0	0	0

MRP14/8: hétérocomplexe natif humain

Sap. B : Saposine B

\*: moyenne de deux essais

Les résultats du tableau 3A montrent que les combinaisons GM2AP/MRP14, GM2AP/MRP14/8, Saposine B/MRP14 et GM2AP/MRP14/Saposine B n'ont aucun effet toxique dans le TUC, quelque soit la quantité testée. Seule la combinaison GM2AP(10ng)/MRP14(0,5ng) semblait présenter une toxicité, mais cette activité toxique n'a ensuite pas été retrouvée dans deux essais supplémentaires comparables. De plus, des essais additionnels ont été réalisés avec la combinaison GM2AP/MRP14 en utilisant différentes quantités de GM2AP et

de MRP14. Les résultats obtenus ont confirmés que la combinaison GM2AP/MRP14 n'a pas d'effet toxique dans le TUC, quelque soit la quantité testée.

Tableau 3 B: Gamme dans les urines normales.

Combinaison de protéines Quantités en ng			Cytotoxicité % Urine normale 1	Cytotoxicité % Urine normale 2
GM2AP	MRP14			
20	1		-10	26
20	0,5		0	25
10	1		3	8
10	0,5		-6	20
0	0		-19	10
Sap. B	MRP14			
30	1		0	16
30	0,5		-4	15
15	1		-10	13
15	0,5		3	11
0	0		-19	10
GM2AP	MRP14	Sap. B		
20	1	30	-19	19
20	1	15	8	9
20	0,5	30	-27	25
20	0,5	15	16	13
10	1	30	7	17
10	1	15	5	32
10	0,5	30	14	23
10	0,5	15	4	22
0	0	0	-88	12

Sap. B: Saposine B

Comme cela ressort du tableau 3B, la combinaison GM2AP/MRP14 est toxique dans l'urine normale puisque la toxicité augmente en fonction de l'augmentation de la quantité de protéine GM2AP. Mais cette toxicité apparaît peu stable et peu reproductible et semble être dépendante de l'échantillon d'urine (voir comparaison du pourcentage de cytotoxicité entre urine normale 1 et urine normale 2, dans le tableau 3B).

La combinaison Saposine B/MRP14 est à la limite de la significativité dans l'urine normale.

Les résultats obtenus avec la combinaison GM2AP/MRP14/Saposine B sont difficilement interprétables.

La toxicité des combinaisons de protéines GM2AP/MRP14 et Saposine B/MRP14 a également été testée vis à vis d'urines normales et d'urines toxiques issues de patients atteints de sclérose en plaques (urine SEP).

Les résultats sont présentés dans le tableau 3C.

Tableau 3C : Gamme dans les urines non SEP et SEP

Combinaisons de protéines (ng)		Cytotoxicité % Urine normale 1	Cytotoxicité % Urine normale 2	Cytotoxicité % Urine SEP
GM2AP	MRP14			
20	1	-10	26	7
20	0,5	0	25	12
10	1	3	8	8
10	0,5	-6	20	9
0	0	-19	10	22
Sap.B	MRP14			
30	1	0	16	32
30	0,5	-4	15	28
15	1	-10	13	16
15	0,5	3	11	14
0	0	-19	10	22

Sap. B : saposine B

La combinaison Saposine B/MRP14 n'a aucun effet toxique dans les urines normales et dans l'urine SEP, quelque soit la quantité testée.

La combinaison GM2AP/MRP14 ne présente pas d'effet toxique vis à vis de l'urine normale 1, mais présente un effet toxique vis à vis de l'urine normale 2 (quand GM2AP augmente, la toxicité de l'urine augmente). On constate par ailleurs un effet inverse vis à vis de l'urine SEP. Quand la quantité de MRP14 augmente, la toxicité de l'urine diminue.

#### Exemple 6 : Toxicité des protéines « humaines »

Les protéines GM2AP, GM2AP mutée dans l'exon 2 et MRP14 produites comme décrit dans l'exemple 3 ont été testées pour leur toxicité par le test MTT, à partir des surnageants de culture des cellules 293T les contenant.

Les combinaisons suivantes ont également été effectuées à partir des surnageants de culture des cellules 293T : GM2AP/MRP14, GM2AP mutée/MRP14, GM2AP/MRP14/MRP8. Les combinaisons préparées ont ensuite été incubées une nuit à 4°C, puis elles ont été testées pour leur toxicité par le test MTT.

Les résultats sont présentés dans le tableau 4.

Tableau 4A

GM2AP (ng)	MRP14 (ng)	C % lot 1 essai 1	C % lot 1 essai 2	C % lot 2 essai 1	C % lot 2 essai 2
20	1	4	23	11	12
20	0,5	31	29	20	20
20	0	-26	-26	8	8
10	1	-13	-13	0	8
10	0,5	-14	-11	6	24
10	0	-25	-25	0	0
0	1	-24	-24	ND	ND
0	0,5	-8	-8	ND	ND

C % : cytotoxicité en pourcentage

ND : non déterminé

Concentrations approximatives en protéines dans les surnageants : MRP14 lots 1 et 2 : 350 ng/ml ; GM2AP lot 1 : 300 ng/ml lot 2 : 200 ng/ml

Pour certaines valeurs, indiquées en caractères gras, certaines combinaisons GM2AP/MRP14 sont faiblement cytotoxiques (de 20 à 30% de cytotoxicité) avec un optimum pour la combinaison GM2AP(20 ng)/MRP14(0,5 ng).

MRP14 seule n'est pas cytotoxique. GM2AP seule n'est pas considérée comme étant cytotoxique, même si une très faible toxicité est retrouvée dans les essais 1 et 2 effectués sur le lot 2. En effet, la reproductibilité ne peut pas être parfaite car elle dépend du lot de production des surnageants.

Tableau 4B

GM2AP (ng)	MRP14 (ng)	C % lot 3 essai 1	C % lot 3 essai 2
100	100	29	41
100	50	36	17
100	10	10	8
100	5	31	1
100	1	rejet	9
100	0	18	2
50	100	rejet	28
50	50	31	16
50	10	21*	-4
50	5	11	-6
50	1	-14	-7
50	0	2	-3
20	100	12*	13
20	50	rejet	22
20	10	-13	4
20	5	-30	4
20	1	-22	-4
20	0	ND	ND
10	100	29*	18
10	50	15	6
10	10	-2	-16
10	5	-22	-7
10	1	-21*	-17
10	0	ND	ND
5	100	22*	32
5	50	-9	9
5	10	-11	1
5	5	-29	-6
5	1	-18	-4
5	0	ND	ND
0	100	31	33
0	50	41*	22
0	10	4	11
0	5	ND	ND
0	1	ND	ND

C % : cytotoxicité en pourcentage

ND : non déterminé

Concentration approximative de GM2AP et MRP14 dans le surnageant : 2 µg/ml

Rejet : % de cytotoxicité rejeté car l'écart type des DO des échantillons est supérieur à 50

\* : écart type des DO des échantillons compris entre 16 et 11

Sans commentaire : écart type des DO des échantillons inférieur à 10.

Les résultats montrent que les protéines seules, dans les surnageants, ne sont pas toxiques, sauf de manière non spécifique à de très fortes quantités (100 ng de MRP14).

Seule la combinaison GM2AP (100 ng)/MRP14 (100 ng) peut être considérée comme présentant une cytotoxicité relative.

Si la protéine GM2AP est remplacée par la protéine GM2AP mutée dans cette combinaison, le même type de toxicité est obtenue pour certains mélanges, comme montré ci-dessous.

Tableau 4C

GM2AP mutée (ng)	MRP14 (ng)	C % lot 2 essai 1	C % lot 2 essai 2	C % lot 2 essai 3
20	1	16	25	53
20	0,5	18*	18	50
10	1	12	15*	21
10	0,5	10	20	25*
10	0	-7	0	-7
0	1	-9	13	-16

C % : cytotoxicité en pourcentage

\* : écart type des DO des échantillons compris entre 14 et 11

Sans commentaire : écart type des DO des échantillons inférieur à 10

Concentration approximative en protéines dans les surnageants : GM2AP mutée : 200 ng/ml ; MRP14 : 350 ng/ml.

Pour de nombreuses valeurs, indiquées en caractères gras, la combinaison GM2AP mutée/MRP14 est toxique. La protéine GM2AP mutée seule n'a pas d'effet cytotoxique. MRP14 seule est considérée comme ne présentant pas d'activité cytotoxique.

La cytotoxicité des combinaisons de surnageants contenant les protéines recombinantes humaines, GM2AP/MRP14 et GM2AP mutée/MRP14 est retrouvée dans un même ordre de grandeur, avec une stabilité plus importante en fonction du lot de production des protéines, qu'avec les protéines recombinantes non humaines. Mais cela ne correspond pas à la stabilité, la reproductibilité et l'intensité de l'activité gliotoxique retrouvée dans les fluides biologiques de patients SEP.

Tableau 4D

GM2AP (ng)	MRP14/18 (ng)	C % lot 1 essai 1	C % lot 1 essai 2	C % lot 2 essai 1
20	20	17	-13	16
20	10	6	-2	23
20	0	-26	-26	8
10	20	-14	-16	1
10	10	-15	-24	12
10	0	-25	-25	0

C % : cytotoxicité en pourcentage

Concentration approximative en protéines dans les surnageants : GM2AP (lot 1) : 300 ng/ml, GM2AP (lot 2) : 200 ng/ml. Concentration de MRP14/8 native : 1,3 mg/ml.

Il ressort des résultats du tableau 4D que GM2AP seule n'a pas d'activité cytotoxique et que pour certaines valeurs, indiquées en caractères gras, la combinaison GM2AP/MRP14/MRP8 a un effet cytotoxique. Cette cytotoxicité est dépendante du lot de surnageant utilisé.

Tableau 4E

GM2AP mutée (ng)	MRP14/18 (ng)	C % lot 2 essai 1
20	20	5
20	10	6
20	0	15
10	20	-18
10	10	4
10	0	-2

C % : cytotoxicité en pourcentage

Concentration approximative en protéines dans les surnageants : GM2AP mutée : 200 ng/ml. Concentration de MRP14/8 native : 1,3 mg/ml.

Il ressort du tableau 4E que la combinaison GM2AP mutée/MRP14/MRP8 ne présente pas d'activité cytotoxique.

Ces études montrent qu'aucune des protéines identifiées dans la fraction gliotoxique purifiée à partir d'urines SEP ne reproduisait, seule, l'activité gliotoxique recherchée et que les combinaisons de protéines produites sous forme de recombinants « non-humains » ou « humains » ne reproduisent que faiblement et de manière peu reproductible (même si une amélioration est notée avec les recombinants « humains ») l'activité gliotoxique. Les résultats obtenus

ne répondent pas à l'ensemble des critères caractérisant l'activité gliotoxique (activité élevée, stabilité, reproductibilité, effet dose-réponse).

Les résultats montrent qu'il manque un composant essentiel qui n'a pas été identifié dans l'analyse protéique.

Les inventeurs ont alors trouvé de manière surprenante que des lipides, notamment des lipides complexes, sont des candidats intéressants dans ce contexte. A cet effet, le ganglioside GM1, le ganglioside GM2 et le sulfatide ont été testés. Parmi ces lipides, le ganglioside GM2 s'est avéré le seul probant, comme le montrent les exemples qui suivent.

**Exemple 7 : Toxicité des protéines recombinantes « humaines » en association avec le ganglioside GM2.**

Le ganglioside GM2 (fourni par le Professeur J. Portoukalian (Lyon France)) est ajouté à une concentration de 50 µg/ml final aux combinaisons de protéines recombinantes « humaines » déjà réalisées, impliquant les protéines MRP14, GM2AP et GM2AP mutée.

Les combinaisons GM2AP/MRP14 et GM2AP mutée/MRP14 ont été testées dans une gamme de protéine: 0, 5, 10, 20, 50, 100 ng pour les protéines recombinantes GM2AP et GM2AP mutée et jusqu'à 200 ng pour la protéine MRP14. Ces gammes ont été faites en association ou non avec le ganglioside GM2. Après mélange, les combinaisons sont incubées une nuit à 4°C, leur toxicité est ensuite évaluée par le test MTT.

Les résultats obtenus sont décrits dans le tableau 5 et dans la figure annexée.

Tableau 5A



Mesure de l'activité gliotoxique des protéines «humaines » combinées et associées au ganglioside GM2 (50 µg/ml final)

GM2AP (ng)	MRP14 (ng)	C % avec gM2G lot 3
100	100	56*
100	10	58
100	5	71
100	1	49
100	0	20
50	100	64*
50	10	33
50	5	29
50	1	32*
50	0	17
20	100	56
20	10	14
20	5	6
20	1	6
20	0	-5
10	100	43
10	10	26
10	5	8
10	1	4
10	0	-15
5	100	13
5	10	7
5	5	-2
5	1	-16
5	0	-10
0	100	30
0	10	-23
0	5	-19
0	1	-8
0	0	8

C %: cytotoxicité en pourcentage

gGM2 : ganglioside GM2

\* : Ecart type DO des échantillons compris entre 13 et 11

Sans commentaire : Ecart type DO des échantillons inférieur à 10

Concentrations approximatives dans les surnageants : GM2AP et MRP14 : 2 µg/ml

La combinaison GM2AP/MRP14 associée à une concentration constante de ganglioside présente un effet gliotoxique qui augmente parallèlement à la quantité en protéine MRP14. De plus, pour des quantités croissantes de la protéine GM2AP (20 et 10 ng), un effet de dose-réponse typique s'élevant par paliers, est obtenu. Cependant aux points extrêmes, lorsqu'il n'y a pas assez de protéine GM2AP (5 ng) il n'y a pas de toxicité. Au contraire, s'il y en a

trop de protéine GM2AP (50 ng et 100 ng) il y a saturation de la toxicité avec un plateau vers 60%. En effet, seules les cellules CLTT1-1 en prolifération dans la culture pendant l'exposition au facteur gliotoxique sont sensibles. Ceci explique que les plateaux de gliotoxicité n'atteignent pas 100%.

Tableau 5B

Mesure de l'activité gliotoxique « des protéines «humaines» combinées, associées ou non, au ganglioside GM2 (50 µg/ml final)

GM2AP mutée (ng)	MRP14 (ng)	C % lot 4 sans gGM2 essai 1	C % lot 4 sans gGM2 essai 2	C % lot 4 avec gGM2 essai 1	C % lot 4 avec gGM2 essai 2
100	200	ND	10	ND	32
100	100	-15	-8	40	55
100	50	-5	-18	37	7
100	10	-8	-33	32	-19
100	5	-15	-33	20	-9
100	1	-5	-26	31	-14
100	0	-11	-44	11	-61
50	200	ND	19	ND	25
50	100	3	5	30	4
50	50	2	-1	18	-21
50	10	-10	-23	17	-28
50	5	-9	-15	-2	-21
50	1	-23	-11	12*	-18
50	0	-7	-40	9	-57
20	200	ND	8	ND	5
20	100	-7	-3	32	-13
20	50	-18	-16	34	-15
20	10	-18	-19	19	-8
20	5	-23	-8	17	13
20	1	-12	-12	16	-20
20	0	-4	-26	1	-33
10	200	ND	-2	ND	33
10	100	-10	-9	24	8
10	50	-12	-19	2	-8
10	10	-17	-16	-6	-34
10	5	-14	-13	-4	-11
10	1	-30	-37	-20	-12
10	0	ND	ND	ND	ND
5	200	ND	-10	ND	26
5	100	-5	-1	39	-17
5	50	-8	-3*	32	-18
5	10	-14	-7	12	-25
5	5	-27	-11	16	-29
5	1	-26	-15	15	-39

5	0	ND	ND	ND	ND
0	200	ND	45	ND	72
0	100	16	12	32	21
0	50	-14	-8	24	-6
0	10	0	-5	8	-6
0	5	ND	ND	ND	ND
0	1	ND	ND	ND	ND
0	0	ND	ND	-21	-21

C %: cytotoxicité en pourcentage

gGM2 : ganglioside GM2

\* : Ecart type DO des échantillons compris entre 13 et 11

Sans commentaire : Ecart type DO des échantillons inférieur à 10

Sans ganglioside GM2, les combinaisons GM2AP mutée/MRP14 ne sont pas gliotoxiques. Une augmentation globale de la cytotoxicité du mélange avec le ganglioside GM2 est observée par rapport aux combinaisons sans ganglioside. La variabilité des mesures est apparemment plus importante avec l'utilisation de la protéine GM2AP mutée. Globalement, l'activité apparaît significative et atteint un plateau maximum (cf. : maximum atteint sur le pool des cellules en prolifération pendant le test, comme discuté précédemment) pour les concentrations les plus fortes, selon un effet-dose à deux variables, GM2AP mutée et MRP14.

Afin de savoir si l'action du ganglioside GM2 est bien spécifique de la toxicité des combinaisons de protéines recombinantes humaines GM2AP/MRP14 (5 ng de MRP14 et 50 ng ou 100 ng de GM2AP), d'autres lipides ont été testés en parallèles : le ganglioside GM1 et le sulfatide. Les gammes de concentration utilisées sont 0, 10, 20, 30, 50 µg/ml final. Une fois les lipides ajoutés, les combinaisons sont incubées une nuit à 4°C, leur toxicité est ensuite évaluée dans le test MTT.

Les résultats, présentés dans les tableaux 5C et 5D, montrent que seules les associations avec le ganglioside GM2 pour les combinaisons GM2AP/MRP14 aux doses 30 µg/ml et 50 µg/ml sont toxiques pour les cellules gliales

(respectivement 27% et 30%). Les autres lipides ne montrent aucune toxicité avec les combinaisons protéiques.

Tableau 5C

Influence du ganglioside GM2 dans l'activité gliotoxique des protéines recombinantes « humaines » combinées GM2AP/MRP14

GM2AP (ng)	MRP14 (ng)	Concentration en gGM2 (µg/ml)	Cytotoxicité %
100	5	0	-14
100	5	5	-1
100	5	10	4
100	5	20	15
100	5	30	28
100	5	50	34
50	5	0	10
50	5	5	12
50	5	10	21
50	5	20	24
50	5	30	25
50	5	50	37
-	5	-	-26
100	-	-	-5
50	-	-	-10
100	-	0	-29
100	-	5	-91
100	-	10	-11
100	-	20	-18
100	-	30	-12
100	-	50	-9
-	5	0	-25
-	5	30	-29
-	5	50	-51

Pour l'essai GM2AP 100 ng, il s'agit d'une moyenne de deux essais.

gGM2 : ganglioside GM2

Tableau 5D

Influence du ganglioside GM2 dans l'activité gliotoxique des protéines recombinantes « humaines » combinées GMA2AP/MRP14

GM2AP (100 ng)/MRP14 (5 ng)	Cytotoxicité %
Sans lipide	-12
Avec GM2 (10 µg/ml)	-4
Avec GM2 (20 µg/ml)	2
Avec GM2 (30 µg/ml)	17
Avec GM2 (50 µg/ml)	25
Avec GM1 (10 µg/ml)	-12
Avec GM1 (20 µg/ml)	-4
Avec GM1 (30 µg/ml)	-1
Avec GM1 (50 µg/ml)	2

Avec sulfatide (10 µg/ml)	-12
Avec sulfatide (20 µg/ml)	-19
Avec sulfatide (30 µg/ml)	-13
Avec sulfatide (50 µg/ml)	5
Contrôle GM2AP (100 ng)	-19
Contrôle GM2AP (50 ng)	-32
Contrôle MRP14 (5 ng)	-18
Contrôle GM2	3
Contrôle GM1	rejet
Contrôle sulfatide	-21

Les résultats de l'étude montrent que :

l'activité est associée à un hétérocomplexe protéique impliquant les protéines GM2AP ou GM2AP mutée et MRP14 ;

c'est l'ajout d'un lipide, tel que le ganglioside GM2, qui a permis d'obtenir des niveaux d'activité, une reproductibilité et des effets dose-réponse, compatibles avec la reproduction de l'activité gliotoxique recherchée ;

la mutation trouvée sur la protéine GM2AP n'est pas indispensable au déterminisme de la gliotoxine *in vitro*. Cependant, *in vivo*, elle peut être déterminante si elle est nécessaire pour le processus de biodisponibilité de la protéine GM2AP (par exemple dans le milieu extra-cellulaire du système nerveux central).

Ces éléments démontrent donc qu'un hétérocomplexe MRP14/GM2AP ou MRP14/GM2AP mutée associé au ganglioside GM2 est le vecteur principal, voire unique, de l'activité gliotoxique.

**Exemple 8 : Mise au point d'un immunodosage du complexe gliotoxique - Préparation des échantillons avant le test ELISA.**

(i) Echantillons testés.

Les échantillons testés sont :

d'une part les protéines recombinantes humaines en combinaison (GM2AP+MRP14) avec ou sans ganglioside GM2, dilués ou non dans des urines normales, afin de détecter le complexe recombinant actif,

d'autre part des urines normales et SEP pour une détection directe dans les urines.

Les échantillons, une fois préparés, sont incubés 24 heures à 4°C avant le test de détection.

Les protéines recombinantes « humaines » sont utilisées sous forme de surnageants de production bruts, récupérés après la transfection transitoire des cellules 293T, avec les contrôles négatifs appropriés en parallèle. Les systèmes de dosage des protéines MRP14 et GM2AP utilisés sont semi-quantitatifs et les quantités précisées, indicatives. Les résultats sont présentés dans les exemples qui suivent.

(ii) Traitement des échantillons.

Comme cela est montré, dans les exemples suivants, le procédé de détection utilisant les anticorps anti-MRP14 et anti-GM2AP dans un format ELISA « sandwich », permettent d'obtenir des résultats positifs.

Toutefois, les inventeurs ont optimisé ce procédé de détection en réalisant un traitement préalable de l'échantillon comprenant une étape de digestion par la protéinase K des protéines en présence, suivie d'une étape d'inactivation de cette protéase par un procédé original de précipitation à l'acide trichloroacétique, puis d'une neutralisation du pH avec un tampon tris-maléate,

sélectionné pour sa compatibilité ultérieure avec un essai ELISA sandwich.

Ce traitement de l'échantillon, original dans ses différentes étapes a été appliqué par la suite aux analyses qui sont présentées dans les exemples suivants et est décrit en détail ci-dessous.

Les échantillons (mélange de protéines recombinantes ou urines) sont traités à la protéinase K avant une détection du complexe selon le protocole suivant :

0,3 mg de protéinase K est ajouté pour 100 µl d'échantillon. Après digestion une heure à 37°C, une précipitation à l'acide trichloracétique est réalisée afin d'inhiber l'action de la protéinase K. L'acide trichloracétique 90% (90 g d'acide trichloracétique pour 48 ml d'eau distillée), est ajouté à l'échantillon (15% du volume initial de l'échantillon). Le mélange est incubé 30 minutes à 4°C.

Après centrifugation de 30 minutes à 13 000 tpm, le culot est repris avec un volume égal au volume initial de l'échantillon par le tampon TRIS Maléate 0.2M pH 6,2 (dans les essais sans facteur de concentration) ou dans un volume minimum (pour réaliser une concentration volumique des protéines non digérées).

Après contrôle par la technique de Western Blot des échantillons traités à la protéinase K, une observation peut être faite et le traitement peut être optimisé en augmentant la quantité de protéinase K et son temps d'action.

#### **Exemple 9 : Protocole de détection de l'hétérocomplexe dans un essai ELISA sandwich.**

(i) Obtention des anticorps : les anticorps suivants ont été produits selon les protocoles décrits ci-dessous :

- anticorps polyclonaux (bioMérieux) :

- anticorps polyclonal de lapin 196 (anti-peptide MRP14)
- anticorps polyclonal de lapin 79 (anti-protéine recombinante GM2AP).
- anticorps monoclonaux (bioMérieux) :
  - 4A7B10
  - 5H7C10
  - 2B9H2
  - 10E11A11
  - 13H9C9
  - 19C11C10
  - 13D1E5
  - 2G12H5

Anticorps monoclonaux anti-GM2AP : 10E11A11, 13D1E5, 13H9C9, 19C11C10, 2G12H5.

Les souris ont été immunisées selon le protocole suivant : au jour J0 injection intrapéritonale de 75 µg du complexe GM2AP-MRP14 en présence d'adjuvant de Freund complet. Aux jours J23, J37 nouvelle injection intrapéritonéale de la même quantité de complexe GM2AP-MRP14 en présence d'adjuvant de Freund incomplet. Quatre jours avant la fusion faire une injection intraveineuse de 50 µg d'antigène GM2AP dilué en eau physiologique.

1900 surnageants ont été criblés par technique d'ELISA indirect. Les plaques ont été « coatées » avec 100 µl d'antigène (le complexe GM2AP-MRP14) à 1µg/ml en tampon bicarbonate 0.05M, pH 9.6. Les plaques « coatées » ont été incubées une nuit à la température de 18-22°C. Les plaques ont été saturées avec 200µl de PBS-lait 1% et soumises à incubation 1 heure à 37°+/-2°C. 100 µl de surnageants ou de liquide d'ascites dilués en tampon PBS-tween 20, 0.05% ont été ajoutés et les plaques ont été incubées 1 heure à 37°+/-2°C. 100 µl d'anticorps polyclonal de chèvre anti-Ig(H+L) de



souris conjugué à la phosphatase alcaline (Jackson ImmunoResearch réf:115-055-062), dilué en tampon PBS-BSA 1% au 1/2000, ont été ajoutés et les plaques ont ensuite été incubées 1 heure à 37°+/-2°C. 100µl de PNPP (Biomérieux réf 60002990) à la concentration de 2mg/ml dans de la DEA-HCL (Biomérieux réf 60002989), pH=9,8, ont été ajoutés. Les plaques ont été soumises à incubation pendant 30 minutes à 37°+/-2°C. La réaction a été bloquée par addition de 100 µl de NaOH, 1N. Trois lavages sont effectués entre chaque étape avec 300µl de PBS-tween 20, 0,05%. Un lavage supplémentaire en eau distillée est effectué avant d'ajouter le PNPP.

150 surnageants se sont révélés positifs en ELISA indirect avec une DO > 0.9. Après les tests de spécificité les cinq anticorps précités sont produits.

Anticorps monoclonaux anti-MRP14 : 2B9H2, 4A7B10, .5H7C10.

Les souris ont été immunisées selon le protocole suivant : au jour J0 une injection intrapéritonéale de 75 µg du complexe GM2AP-MRP14 en présence d'adjuvant de Freund complet. Aux jours J23 et J37 injection intrapéritonéale de la même quantité de complexe en présence d'adjuvant de Freund incomplet. Quatre jours avant la fusion une injection intraveineuse de 50 µg d'antigène MRP14 dilué en eau physiologique.

1100 surnageants ont été testés et criblés par la technique d'ELISA indirect, telle que décrite ci-dessus. 300 surnageants se sont révélés positifs avec une DO >1. Après les tests de spécificité les trois anticorps précités sont produits.

Anticorps polyclonal de lapin 79 (anti-protéine recombinante GM2AP).

Les lapins ont été immunisés selon le protocole suivant : au jour J0, 1<sup>ère</sup> prise de sang de 10 ml, 75 µg de GM2AP ont été injectés par voie intrapéritonéale en présence

d'adjuvant de Freund complet (AFC) (75 µg d'immunogène + qsp 0,5 ml d'eau physiologique 9<sup>0</sup>/<sub>00</sub> + 0,5 ml AFC). Aux jours J28 et J56 la même quantité d'immunogène a été injectée par voie intrapéritonéale dans les mêmes conditions en présence de 0,5 ml d'adjuvant de Freund incomplet (AFI). Au jour J63 une 2<sup>ème</sup> prise de sang de 30 ml a été effectuée à l'oreille sans anticoagulant. Une 3<sup>ème</sup> prise de sang a été effectuée dans les mêmes conditions au jour J70.

Anticorps polyclonal de lapin 196 (anti-peptide MRP14).

Les lapins ont été immunisés selon le protocole suivant :

Les lapins ont été immunisés selon le protocole suivant : au jour JO, 1<sup>ère</sup> prise de sang de 10 ml, 80 µg d'immunogène ont été injectés par voie intrapéritonéale en présence d'adjuvant de Freund complet (AFC) (80 µg d'immunogène + qsp 0,5 ml d'eau physiologique 9<sup>0</sup>/<sub>00</sub> + 0,5 ml AFC). Aux jours J28 et J56 la même quantité d'immunogène a été injectée par voie intrapéritonéale dans les mêmes conditions en présence de 0,5 ml d'adjuvant de Freund incomplet (AFI). Au jour J63 une 2<sup>ème</sup> prise de sang de 30 ml a été effectuée à l'oreille sans anticoagulant. Une 3<sup>ème</sup> prise de sang a été effectuée dans les mêmes conditions au jour J70.

Ces anticorps sont utilisés en capture ou en détection. Quand ils sont utilisés en détection dans le test sandwich ELISA, les anticorps sont biotinylés.

(ii) Test ELISA sandwich:

Le traitement des échantillons (protéinase K et précipitation TCA), s'il a lieu, est réalisé après la nuit d'incubation à 4 °C et avant le test de détection ELISA sandwich.

L'anticorps de capture est « coaté » à 1 µg en tampon carbonate-bicarbonate (50mM) pH 9.5, 100 µl sont

déposés dans les puits d'une microplaque à 96 puits. La plaque est recouverte d'un film protecteur et incubée une nuit à température ambiante. Après 3 lavages en PBS (Phosphate Buffered Saline) Tween 0,05%, les sites non spécifiques sont bloqués par PBS Tween 0,05%, sérum de chèvre (1/10<sup>e</sup>) pour les anticorps monoclonaux ou 100 µl d'hydrolysate de caséine pour les anticorps polyclonaux. Après 3 lavages en PBS Tween 0,05%, les échantillons traités ou non sont déposés à raison de 100 µl par puits et incubés ainsi 1 heure 30 minutes à 37 °C sous agitation.

Après 3 lavages en PBS Tween 0,05%, 100 µl d'anticorps de détection biotinylés à 1 µg/ml sont déposés dans chaque puits et incubés 1 heure 30 minutes à 37°C.

Après 3 lavages en PBS Tween 0,05%, 100 µl de streptavidine couplée à la HRP (peroxydase de raifort) à 0,2 µg/ml sont déposés dans chaque puits et incubés 1 heure 30 minutes à 37°C afin d'amplifier le signal.

Après 3 lavages en PBS Tween 0,05%, 100 µl de solution d'OPD (dihydrochlorure d'orthophénylène diamine) à 2 g/l sont déposés dans chaque puit et incubés 10 minutes à température ambiante. La réaction est stoppée avec 100 µl de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1N. La lecture de la densité optique est effectuée à 492 nm.

De la même façon pour la production d'anticorps anti- hétérocomplexe on utilise l'hétérocomplexe GM2AP/GM2/MRP14 ou GM2AP mutée/GM2/MRP14 comme immunogène pour immuniser des souris BALB/c par injection par voie intrapéritonéale. La première injection est réalisée avec de l'adjuvant complet de Freund. Les autres injections sont réalisées à 4-8 semaines d'intervalle avec de l'adjuvant de Freund incomplet. Un dernier rappel est effectué quelques jours avant la fusion en eau physiologique. Après ce rappel on prélève les rates des souris immunisées et on recueille les splénocytes. Puis on réalise la fusion des cellules

spléniques avec des cellules d'une lignée myélomateuse et on sélectionne les cellules sécrétant des anticorps qui reconnaissent en ELISA l'hétérocomplexe utilisé pour l'immunisation. On sélectionne finalement les clones produisant des anticorps spécifiques de l'hétérocomplexe immun, c'est à dire qui ne reconnaissent pas ni GM2AP, ou GM2AP mutée, ni MRP14, seuls.

**Exemple 10 : Détection de l'hétérocomplexe recombinant humain.**

Les dosages immuno-enzymatiques de l'activité gliotoxique caractérisée moléculairement dans les exemples précédents passent par un système antigène/anticorps mettant seulement en jeu les protéines impliquées (les protéines GM2AP, GM2AP mutée et MRP14) et par des anticorps (seuls ou en association) capables de détecter ce complexe moléculaire.

Le complexe recombinant correspond à l'association des surnageants de protéines recombinantes GM2AP (1000 ng) et MRP14 (50 ng) associées à 50 µg/ml final de ganglioside GM2.

(i) Détection de l'hétérocomplexe gliotoxique recombinant sans traitement à la protéinase K.

Afin de savoir si les combinaisons toxiques étaient directement détectables, les protéines recombinantes « humaines » MRP14 et GM2AP sont combinées avec le ganglioside GM2, incubées une nuit à 4°C et testées par le test ELISA sandwich en utilisant les anticorps anti-MRP14 et anti-GM2AP.

Les combinaisons [MRP14, GM2AP et ganglioside GM2] sont diluées dans des urines normales (non gliotoxiques dans le test de toxicité MTT). Les résultats sont présentés dans le tableau 6. Ces résultats montrent que des couples d'anticorps de capture anti-GM2AP/détection anti-MRP14

reconnaissent le complexe recombinant de façon extrêmement reproductible. Les résultats sont présentés dans le tableau 6.

Tableau 6

Anticorps capture	Anticorps détection	Essais positifs	Total essais
4A7B10 + 5H7C10	10E11A11	0	3
	13D1E5 + 2G12H5	0	1
	13H9C9 + 19C11C10	0	3
	79	0	1
2B9H2	10E11A11	1	3
	13D1E5 + 2G12H5	0	1
	13H9C9 + 19C11C10	0	3
	79	0	2
10E11A11	4A7B10 +5H7C10	2	1
	2B9H2	0	2
	196	0	1
13D1E5 + 2G12H5	4A7B10 +5H7C10	1	2
	2B9H2	0	2
	196	0	2
13H9C9 +19C11C10	4A7B10 +5H7C10	0	1
	2B9H2	0	1
	196	0	1
79	4A7B10 +5H7C10	2	2
	2B9H2	2	2
	196	0	1

Essais positives: nombre d'essais positifs

Total essais : nombre total d'essais.

(ii) Détection de l'hétérocomplexe gliotoxique recombinant après traitement à la protéinase K.

Comme décrit précédemment, l'activité gliotoxique résiste à la protéinase K. Aussi, en traitant les échantillons (combinaison GM2AP+MRP14+GM2) à la protéinase K, les protéines non complexées sont détruites, et le bruit de fond est diminué.

Comme dans la partie précédente, les combinaisons sont incubés à 4°C durant une nuit. Mais avant de les tester, les échantillons sont traités à la protéinase K et précipités au TCA (acide trichloroacétique), suivant le protocole décrit dans l'exemple 8 (ii).

Les résultats sont présentés dans le tableau 7. Ces résultats montrent notamment que les couples de capture anti-MRP14/détection anti-GM2AP [4A7B10+5H7C10]/[13H9C9+19C11C10], [4A7B10+5H7C10]/10E11A11, 2B9H2/10E11A11 et 2B9H2/[13H9C9+19C11C10] détectent le complexe recombinant dans les surnageants dilués dans les urines, après traitement à la protéinase K, de façon extrêmement reproductible. Le bruit de fond est significativement atténué.

Tableau 7

Anticorps capture	Anticorps détection	Essais positifs	Total essais
4A7B10 + 5H7C10	10E11A11	2	3
	13D1E5 + 2G12H5	0	1
	13H9C9 + 19C11C10	2	3
	79	0	1
2B9H2	10E11A11	2	3
	13D1E5 + 2G12H5	0	1
	13H9C9 + 19C11C10	2	3
	79	0	2
10E11A11	4A7B10 + 5H7C10	0	2
	2B9H2	0	1
	196	0	1
13D1E5 + 2G12H5	4A7B10 +5H7C10	1	2
	2B9H2	0	2
	196	0	2
13H9C9 +19C11C10	4A7B10 +5H7C10	0	1
	2B9H2	0	1
	196	0	1
79	4A7B10 +5H7C10	0	2
	2B9H2	1	2
	196	0	1

Essais positives: nombre d'essais positifs

Total essais : nombre total d'essais

### Exemple 11 : Détection de l'hétérocomplexe dans les urines de patients.

La détection directe du complexe dans les urines de patients a été testée sur deux urines représentatives: une urine SEP et une urine normale.

Les résultats sont décrits le tableau 8. Ces résultats montrent que les couples d'anticorps de capture anti-MRP14/détection anti-GM2AP [4A7B10+5H7C10]/[13D1E5+2G12H5], [4A7B10+5H7C10]/10E11A11, 2B9H2/[13D1E5+2G12H5] et 2B9H2/[13H9C9+19C11C10] détectent le complexe.

Tableau 8

Anticorps de capture	Anticorps de détection	Nombre d'essais	Urines sans traitement à la protéinase K	
			SEP	normale
2B9H2	13H9C9 + 19C11C10	1	0	0
		2	0	0
4A7B10 +5H7C10	10E11A11	1	0,102	0,067
		2	0,030	0,011
4A7B10 +5H7C10	13D1E5 + 2G12H5	1	0,117	0
2B9H2	13D1E5 + 2G12H5	1	0,152	0,006
Anticorps de capture	Anticorps de détection	Nombre d'essais	Urine après traitement à la protéinase K	
			SEP	normale
2B9H2	13H9C9 + 19C11C10	1	0,149	0,060
		2	0,141	0,020
4A7B10 +5H7C10	10E11A11	1	0,130	0,087
		2	0,741	0,563
4A7B10 +5H7C10	13D1E5 + 2G12H5	1	0,467	0,328
2B9H2	13D1E5 + 2G12H5	1	0,111	0,12

Pour les urines traitées à la protéinase K, il n'y a pas de concentration avec le TCA

Les procédés décrits dans les exemples sont utiles comme outils de diagnostic, permettant le dosage d'un marqueur biologique de la sclérose en plaques, puisque les corrélations entre l'activité gliotoxique et la clinique se sont avérées très bonnes<sup>1,3,4</sup>.

**Références bibliographiques :**

1. Malcus-Vocanson, C. et al.(1998) A urinary marker for multiple sclerosis [letter]. *Lancet* 351, 1330.
2. Menard, A. et al.(1997) Gliotoxicity, reverse transcriptase activity and retroviral RNA in monocyte/macrophage culture supernatants from patients with multiple sclerosis. *FEBS Lett* 413, 477-85.
3. Menard, A. et al.(1998) Detection of a gliotoxic activity in the cerebrospinal fluid from multiple sclerosis patients. *Neurosci Lett* 245, 49-52.
4. Malcus-Vocanson, C. et al.(2001) Glial Toxicity in urine and Multiple Sclerosis. *Multiple Sclerosis* 7, 383-388.
5. N. Benjelloun et al. *Cell. Mol. Biol.*, 1998, 44 (4), 579-583.
6. Blazar et al., (1997) *Journal of Immunology* 159 : 5821-5833.
7. Bird et al., (1988) *Science* 242 : 423-426.
8. Arakawa et al., (1996) *J. Biochem* 120 : 657-662.
9. Chaudray et al., (1989) *Nature* 339 : 394-397.
10. Jones et al., *Nature* 321 : 522-525 (1986).
11. Reichmann et al., *Nature* 332 : 323-329 (1988).
12. Presta et al., *Curr. Op. Struct. Biol.* 2 : 593-596 (1992).
13. Galiana et al., *J. Neurosci. Res.* (1990) 26 :269-277.



**REVENDICATIONS**

1. Facteur cytotoxique isolé, associé à la sclérose en plaques, ledit facteur cytotoxique étant choisi parmi l'hétérocomplexe GM2AP/GM2/MRP14 et GM2AP mutée/GM2/MRP14 dans lequel GM2AP mutée correspond à la séquence SEQ ID NO : 2.

2. Procédé de détection et/ou de quantification d'un facteur cytotoxique, associé à la sclérose en plaques, dans un échantillon biologique, selon lequel on isole dudit échantillon biologique un hétérocomplexe choisi parmi l'hétérocomplexe GM2AP/GM2/MRP14 et GM2AP mutée/GM2/MRP14 dans lequel GM2AP mutée correspond à la séquence SEQ ID NO : 2.

3. Procédé selon la revendication 2, selon lequel on isole l'hétérocomplexe à l'aide d'au moins un anticorps qui se lie spécifiquement à l'hétérocomplexe, et on détecte et/ou quantifie ledit facteur cytotoxique par la mise en évidence de la formation d'un complexe constitué par l'hétérocomplexe et l'anticorps.

4. Procédé selon la revendication 3, selon lequel on isole l'hétérocomplexe à l'aide d'au moins deux anticorps qui se lient spécifiquement à l'hétérocomplexe, et on détecte et/ou quantifie ledit facteur cytotoxique par la mise en évidence de la formation d'un complexe constitué par l'hétérocomplexe et les deux anticorps.

5. Procédé selon la revendication 4, selon lequel au moins l'un desdits anticorps est un anticorps de capture et au moins l'autre desdits anticorps est un anticorps de détection.

6. Procédé selon la revendication 2, selon lequel on isole l'hétérocomplexe à l'aide d'au moins deux anticorps dont au moins l'un se lie spécifiquement à GM2AP ou GM2AP mutée de l'hétérocomplexe, et au moins l'autre se lie spécifiquement à MRP14 de l'hétérocomplexe, et

on détecte et/ou quantifie ledit facteur cytotoxique par la mise en évidence de la formation d'un complexe constitué par l'hétérocomplexe et les deux anticorps.

7. Procédé selon la revendication 6, selon lequel au moins l'un desdits anticorps est un anticorps de capture et au moins l'autre desdits anticorps est un anticorps de détection.

8. Procédé selon l'une quelconque des revendications 2 à 7, selon lequel l'échantillon à tester est soumis à un traitement préalable comprenant :

une étape de digestion des protéines de l'échantillon par la protéinase K,

une étape d'inactivation de la protéinase K, et

une étape de neutralisation du pH.

9. Procédé selon la revendication 8, dans lequel l'étape d'inactivation de la protéinase K est réalisée par précipitation à l'acide trichloroacétique, et l'étape de neutralisation du pH est réalisée par addition d'un tampon tris-maléate.

10. Procédé selon l'une quelconque des revendications 2 à 9, dans lequel l'échantillon biologique est choisi parmi le sérum, le plasma, l'urine et le liquide céphalorachidien.

11. Composition pour la détection et/ou de quantification d'un facteur cytotoxique associé à la sclérose en plaques, ledit facteur cytotoxique étant choisi parmi l'hétérocomplexe GM2AP/GM2/MRP14 et GM2AP mutée/GM2/MRP14 dans lequel GM2AP mutée correspond à la séquence SEQ ID NO : 2, caractérisée en ce qu'elle comprend au moins un anticorps qui se lie spécifiquement à l'hétérocomplexe.

12. Composition selon la revendication 11, caractérisée en ce qu'elle comprend au moins deux anticorps qui se lient spécifiquement à l'hétérocomplexe.

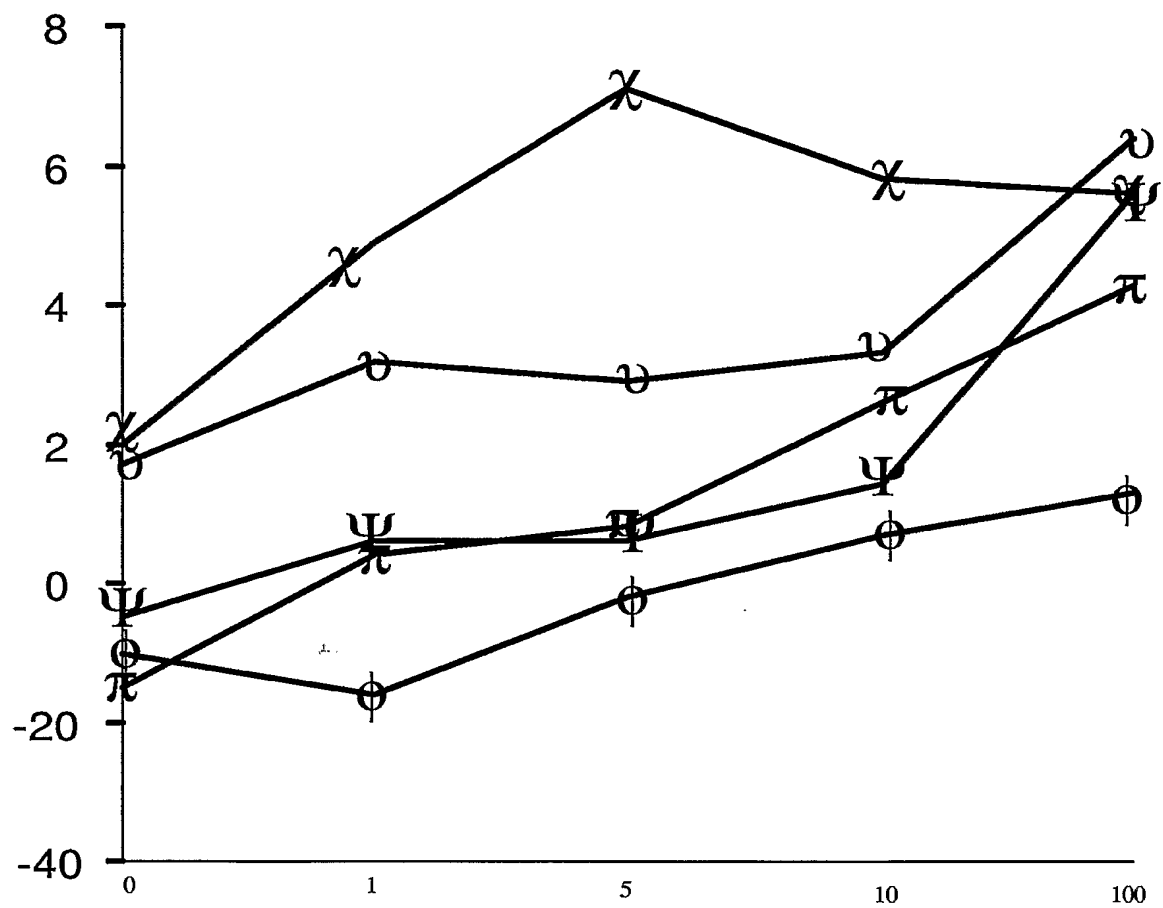
13. Mélange réactionnel pour la détection et/ou de quantification d'un facteur cytotoxique associé à la sclérose en plaques, ledit facteur cytotoxique étant choisi parmi l'hétérocomplexe GM2AP/GM2/MRP14 et GM2AP mutée/GM2/MRP14 dans lequel GM2AP mutée correspond à la séquence SEQ ID NO : 2, caractérisée en ce qu'il comprend au moins deux anticorps dont au moins l'un se lie spécifiquement à GM2AP ou GM2AP mutée de l'hétérocomplexe et au moins l'autre se lie spécifiquement à MRP14 de l'hétérocomplexe.

14. Mélange réactionnel selon la revendication 13 caractérisé en ce que au moins l'un desdits anticorps est un anticorps de capture et au moins l'autre desdits anticorps est un anticorps de détection.

15. Complexe comprenant l'hétérocomplexe GM2AP/GM2/MRP14 ou GM2AP mutée/GM2/MRP14, ledit hétérocomplexe étant lié à au moins deux anticorps, dont au moins l'un des anticorps est spécifique de GM2AP ou de GM2AP mutée et au moins l'autre anticorps est spécifique de MRP14.

## FIGURE UNIQUE

1 / 1



## 1

## SEQUENCE LISTING

<110> bioMérieux  
Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale

<120> Facteur cytotoxique isolé associé à la sclérose en plaques et procédé de  
détection dudit facteur cytotoxique

<130> SEP 25

<160> 3

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1  
<211> 193  
<212> PRT  
<213> Artificial sequence

<220>  
<223> protéine recombinante

<400> 1

Met Gln Ser Leu Met Gln Ala Pro Leu Leu Ile Ala Leu Gly Leu Leu  
1 5 10 15

Leu Ala Ala Pro Ala Gln Ala His Leu Lys Lys Pro Ser Gln Leu Ser  
20 25 30

Ser Phe Ser Trp Asp Asn Cys Asp Glu Gly Lys Asp Pro Ala Val Ile  
35 40 45

Arg Ser Leu Thr Leu Glu Pro Asp Pro Ile Ile Val Pro Gly Asn Val  
50 55 60

Thr Leu Ser Val Met Gly Ser Thr Ser Val Pro Leu Ser Ser Pro Leu  
65 70 75 80

Lys Val Asp Leu Val Leu Glu Lys Glu Val Ala Gly Leu Trp Ile Lys  
85 90 95

Ile Pro Cys Thr Asp Tyr Ile Gly Ser Cys Thr Phe Glu His Phe Cys  
100 105 110

Asp Val Leu Asp Met Leu Ile Pro Thr Gly Glu Pro Cys Pro Glu Pro  
115 120 125

Leu Arg Thr Tyr Gly Leu Pro Cys His Cys Pro Phe Lys Glu Gly Thr  
130 135 140

Tyr Ser Leu Pro Lys Ser Glu Phe Val Val Pro Asp Leu Glu Leu Pro  
145 150 155 160

Ser Trp Leu Thr Thr Gly Asn Tyr Arg Ile Lys Ser Val Leu Ser Ser  
165 170 175

Ser Gly Lys Arg Leu Gly Cys Ile Lys Ile Ala Ala Ser Leu Lys Gly  
180 185 190

2

Ile

<210> 2  
 <211> 193  
 <212> PRT  
 <213> Artificial sequence  
  
 <220>  
 <223> protéine recombinante  
  
 <400> 2

```

Met Gln Ser Leu Met Gln Ala Pro Leu Leu Ile Ala Leu Gly Leu Leu
1           5           10           15

Leu Ala Ala Pro Ala Gln Ala His Leu Lys Lys Pro Ser Gln Leu Ser
          20           25           30

Ser Phe Ser Trp Asp Asn Cys Phe Glu Gly Lys Asp Pro Ala Val Ile
          35           40           45

Arg Ser Leu Thr Leu Glu Pro Asp Pro Ile Ile Val Pro Gly Asn Val
          50           55           60

Thr Leu Ser Val Met Gly Ser Thr Ser Val Pro Leu Ser Ser Pro Leu
65           70           75           80

Lys Val Asp Leu Val Leu Glu Lys Glu Val Ala Gly Leu Trp Ile Lys
          85           90           95

Ile Pro Cys Thr Asp Tyr Ile Gly Ser Cys Thr Phe Glu His Phe Cys
          100          105          110

Asp Val Leu Asp Met Leu Ile Pro Thr Gly Glu Pro Cys Pro Glu Pro
          115          120          125

Leu Arg Thr Tyr Gly Leu Pro Cys His Cys Pro Phe Lys Glu Gly Thr
          130          135          140

Tyr Ser Leu Pro Lys Ser Glu Phe Val Val Pro Asp Leu Glu Leu Pro
145          150          155          160

Ser Trp Leu Thr Thr Gly Asn Tyr Arg Ile Lys Ser Val Leu Ser Ser
          165          170          175

Ser Gly Lys Arg Leu Gly Cys Ile Lys Ile Ala Ala Ser Leu Lys Gly
          180          185          190
  
```

Ile

<210> 3  
 <211> 193  
 <212> PRT  
 <213> Artificial sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; protéine recombinante

&lt;400&gt; 3

Met Gln Ser Leu Met Gln Ala Pro Leu Leu Ile Ala Leu Gly Leu Leu  
 1 5 10 15  
 Leu Ala Thr Pro Ala Gln Ala His Leu Lys Lys Pro Ser Gln Leu Ser  
 20 25 30  
 Ser Phe Ser Trp Asp Asn Cys Phe Glu Gly Lys Asp Pro Ala Val Ile  
 35 40 45  
 Arg Ser Leu Thr Leu Glu Pro Asp Pro Ile Val Val Pro Gly Asn Val  
 50 55 60  
 Thr Leu Ser Val Val Gly Ser Thr Ser Val Pro Leu Ser Ser Pro Leu  
 65 70 75 80  
 Lys Val Asp Leu Val Leu Glu Lys Glu Val Ala Gly Leu Trp Ile Lys  
 85 90 95  
 Ile Pro Cys Thr Asp Tyr Ile Gly Ser Cys Thr Phe Glu His Phe Cys  
 100 105 110  
 Asp Val Leu Asp Met Leu Ile Pro Thr Gly Glu Pro Cys Pro Glu Pro  
 115 120 125  
 Leu Arg Thr Tyr Gly Leu Pro Cys His Cys Pro Phe Lys Glu Gly Thr  
 130 135 140  
 Tyr Ser Leu Pro Lys Ser Glu Phe Ala Val Pro Asp Leu Glu Leu Pro  
 145 150 155 160  
 Ser Trp Leu Thr Thr Gly Asn Tyr Arg Ile Glu Ser Val Leu Ser Ser  
 165 170 175  
 Ser Gly Lys Arg Leu Gly Cys Ile Lys Ile Ala Ala Ser Leu Lys Gly  
 180 185 190  
 Ile

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/FR2004/050748

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 7 C07K14/52  
 //(C07K14/52, 14:47)

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 C07K G01N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, BIOSIS, EMBASE, WPI Data, PAJ

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 01/05422 A (KOLBE HANNO ; MALCUS CARINE (FR); PERRON HERVE (FR); SANTORO LYSE (FR)) 25 January 2001 (2001-01-25) examples claims	2-14
A	RIEGER F ET AL: "UN FACTEUR GLIOTOXIQUE ET LA SCLEROSE EN PLAQUES GLIOTOXICITY IN MULTIPLE SCLEROSIS" COMPTES RENDUS DES SEANCES DE L'ACADEMIE DES SCIENCES. SERIE III: SCIENCES DE LA VIE, ELSEVIER, AMSTERDAM, NL, vol. 319, no. 4, 1 April 1996 (1996-04-01), pages 343-350, XP000602023 ISSN: 0764-4469 the whole document ----- -/-	1-15

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

\* Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

3 May 2005

Date of mailing of the international search report

18/05/2005

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2  
 NL - 2280 HV Rijswijk  
 Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
 Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Didelon, F



# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/FR2004/050748

## C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category °	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	<p>MALCUS-VOCANSON C ET AL: "Glial toxicity in urine and multiple sclerosis" MULTIPLE SCLEROSIS, vol. 7, no. 6, December 2001 (2001-12), pages 383-388, XP009034098 ISSN: 1352-4585 the whole document</p> <p>-----</p>	1-15
A	<p>MENARD ARMELLE ET AL: "A gliotoxic factor and multiple sclerosis" JOURNAL OF THE NEUROLOGICAL SCIENCES, vol. 154, no. 2, 5 February 1998 (1998-02-05), pages 209-221, XP002289708 ISSN: 0022-510X the whole document</p> <p>-----</p>	1-15

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/FR2004/050748

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 0105422	A	25-01-2001	FR 2797402 A1	16-02-2001
			AU 6576800 A	05-02-2001
			CA 2379336 A1	25-01-2001
			EP 1203239 A2	08-05-2002
			WO 0105422 A2	25-01-2001
			JP 2003509340 T	11-03-2003
<hr/>				

# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande Internationale No

PCT/FR2004/050748

<b>A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE</b> CIB 7    C07K14/52 //(C07K14/52,14:47)		
Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB		
<b>B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE</b>		
Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement) CIB 7    C07K    G01N		
Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche		
Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si réalisable, termes de recherche utilisés) EPO-Internal, BIOSIS, EMBASE, WPI Data, PAJ		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS</b>		
Catégorie °	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	WO 01/05422 A (KOLBE HANNO ; MALCUS CARINE (FR); PERRON HERVE (FR); SANTORO LYSE (FR)) 25 janvier 2001 (2001-01-25) exemples revendications	2-14
A	----- RIEGER F ET AL: "UN FACTEUR GLIOTOXIQUE ET LA SCLEROSE EN PLAQUES GLIOTOXICITY IN MULTIPLE SCLEROSIS" COMPTES RENDUS DES SEANCES DE L'ACADEMIE DES SCIENCES. SERIE III: SCIENCES DE LA VIE, ELSEVIER, AMSTERDAM, NL, vol. 319, no. 4, 1 avril 1996 (1996-04-01), pages 343-350, XP000602023 ISSN: 0764-4469 le document en entier ----- <div style="text-align: right;">-/--</div>	1-15
<div style="display: flex; justify-content: space-between;"> <span><input checked="" type="checkbox"/> Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents</span> <span><input checked="" type="checkbox"/> Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe</span> </div>		
<div style="display: flex;"> <div style="flex: 1;"> <p>° Catégories spéciales de documents cités:</p> <p>"A" document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent</p> <p>"E" document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date</p> <p>"L" document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)</p> <p>"O" document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens</p> <p>"P" document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée</p> </div> <div style="flex: 1;"> <p>"T" document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention</p> <p>"X" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément</p> <p>"Y" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier</p> <p>"&amp;" document qui fait partie de la même famille de brevets</p> </div> </div>		
Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée <div style="text-align: center; font-weight: bold;">3 mai 2005</div>		Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale <div style="text-align: center; font-weight: bold;">18/05/2005</div>
Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016		Fonctionnaire autorisé <div style="text-align: center; font-weight: bold;">Didelon, F</div>

# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande Internationale No

PCT/FR2004/050748

## C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie *	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	<p>MALCUS-VOCANSON C ET AL: "Glial toxicity in urine and multiple sclerosis"  MULTIPLE SCLEROSIS,  vol. 7, no. 6, décembre 2001 (2001-12),  pages 383-388, XP009034098  ISSN: 1352-4585  le document en entier  -----</p>	1-15
A	<p>MENARD ARMELLE ET AL: "A gliotoxic factor and multiple sclerosis"  JOURNAL OF THE NEUROLOGICAL SCIENCES,  vol. 154, no. 2,  5 février 1998 (1998-02-05), pages  209-221, XP002289708  ISSN: 0022-510X  le document en entier  -----</p>	1-15

# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

Demande Internationale No

PCT/FR2004/050748

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
WO 0105422 A	25-01-2001	FR 2797402 A1	16-02-2001
		AU 6576800 A	05-02-2001
		CA 2379336 A1	25-01-2001
		EP 1203239 A2	08-05-2002
		WO 0105422 A2	25-01-2001
		JP 2003509340 T	11-03-2003
-----			